

# Asociación de la expresión de los receptores de TNF- $\alpha$ (TNFR1 y TNFR2) al estadio de cáncer de mama

Cap. 1/o. I.C.E. César Antonio **González-Díaz,\*** Tte. Cor. M.C. Esaú **Floriano-Sánchez,\*\***  
 Mayor M.C. Jorge Benjamín de Jesús **Suárez-San Gabriel,\*** M. en C. Noemí **Cárdenas-Rodríguez,\*\***  
 M. en C. Cindy **Rodríguez-Bandala,\*\*** Mayor M.C. Raúl **Aragón-Franco,\*\*** Mayor M.C. Jaime **López-Cruz,\*\*\***  
 Mayor M.C. Gildardo Agustín **Garrido-Sánchez,\*\*\*\*** Tte. Q.B. Jesús Gabriel **Silva-Escobedo\***

Escuela Militar de Graduados de Sanidad/Escuela Médico Militar/  
 Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología/Hospital Central Militar.

## RESUMEN

**Introducción.** El cáncer es un crecimiento celular no controlado por los ciclos de regulación normales que llevan a morbi-mortalidad del individuo. A nivel de salud pública mundial es un fenómeno demográfico creciente. En particular el cáncer mamario es la primera causa de mortalidad en mujeres. Este padecimiento se estadia mediante la clasificación TNM o el grado histológico Bloom-Richardson. Estudios previos en tejidos neoplásicos mamarios han correlacionado la expresión del receptor 1 del TNF- $\alpha$  (TNFR1), con el fenómeno de apoptosis y la expresión del receptor 2 del TNF- $\alpha$  (TNFR2) con el fenómeno de hiperproliferación.

**Objetivo.** Analizar la expresión de los receptores TNFR1, TNFR2, ErbB2 y receptor de IL-10, de estrógenos y de progesterona, en tejidos de cáncer de mama producto de mastectomía radical modificada realizada en la Clínica de Especialidades de la Mujer y correlacionarlas con el estadio TNM y el grado histológico Bloom-Richardson en niveles tisulares de estroma y glándula.

**Material y métodos.** Se utilizó la técnica inmunohistoquímica para determinar la expresión de TNFR1, TNFR2, ErbB2 y receptor de IL-10, de estrógenos y de progesterona en muestras de tejido de cáncer de mama y para realizar la medición de unidades de densidad óptica en el microscopio confocal Axiocam zs-300 Carl Zeiss de la Escuela Médico Militar y correlacionar estas mediciones con el estadio TNM y grado histológico Bloom-Richardson.

**Resultados.** Se observó que la expresión del TNFR1 no mostró asociación con el estadio TNM ni con el grado de diferenciación celular de Bloom-Richardson. La expresión del TNFR2 (receptor transmembranal de localización normal en todas las células del sistema hematopoyético que infiltran los tumores, excepto en los eritrocitos) mostró una asociación con los estadios TNM tanto en

## *Association of expression of TNF receptor- $\alpha$ (TNFR1 and TNFR2) the stage of breast cancer patients*

## SUMMARY

**Introduction.** Cancer is uncontrolled cell growth regulation by normal cycles that lead to morbidity and mortality of the individual. On a global public health is a growing demographic phenomenon. In particular breast cancer is the leading cause of death in women. This condition is staged by TNM2 classification or histological grade Bloom-Richardson. Previous studies in malignant breast tissue have correlated the expression of TNF receptor 1- $\alpha$  (TNFR1), the phenomenon of apoptosis and expression of TNF receptor 2- $\alpha$  (TNFR2) with the phenomenon of hiperproliferation.

**Objective.** To analyze the expression of the receptors TNFR1, TNFR2, ErbB2 and IL-10 receptor, estrogen and progesterone receptors in breast cancer tissue product made in modified radical mastectomy Specialty Clinic of Women and correlated with TNM stage and Bloom-Richardson histologic grade levels and gland tissue stroma.

**Material and methods.** Immunohistochemistry technique was used to determine the expression of TNFR1, TNFR2, ErbB2 and IL-10 receptor, estrogen and progesterone on tissue samples from breast cancer and for the measurement of optical density unities under the Military Medical School's microscope confocal Axiocam zs -300 Carl Zeiss and correlate these measurements with TNM stage and histological grade Bloom-Richardson.

**Results.** It was observed that the expression of TNFR1 was not associated with TNM stage or the degree of cellular differentiation of Bloom-Richardson. The expression of TNFR2 (normal trans-

\* Escuela Militar de Graduados de Sanidad. \*\* Escuela Médico Militar. \*\*\* Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología. \*\*\*\* Hospital Central Militar.

## Correspondencia:

Mayor M.C. Jorge Benjamín de Jesús Suárez-San Gabriel.

Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicanos, Cerrada de Palomas S/N Esq. Periférico Norte, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F.

Correo electrónico: inmunolsuarez@yahoo.com.mx

Recibido: Abril 10, 2013.

Aceptado: Agosto 23, 2013.

la porción glandular como del estroma. El *receptor de IL-10* presentó una asociación inversamente proporcional a nivel del estroma con el estadio TNM, lo cual concuerda con las bases teóricas al respecto publicadas en la literatura. El *ErbB2* relacionado con los factores tróficos del crecimiento tisular, mostró a nivel de la matriz estromal, una asociación directamente proporcional a estadio TNM, y diferencias estadísticamente significativas al comparar pareadamente los TNM2 y TNM4. Los *receptores de estrógenos y de progesterona*, moléculas de localización nuclear, presentaron una asociación directamente proporcional al índice histológico de Bloom-Richardson, cuyos criterios de abordaje histopatológico incluyen la valoración del pleomorfismo o distorsión nuclear.

**Palabras clave:** Grado histopatológico, estadio oncológico, receptores relacionados a apoptosis, receptores relacionados a proliferación celular, receptores hormonales, receptores de citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias.

## Introducción

El cáncer en general es un conjunto de enfermedades en las cuales se produce un exceso de células con crecimiento, división y características más allá de límites normales. En medicina es un trastorno hiperproliferativo que involucra la desregulación negativa de la apoptosis y cambios morfológicos celulares adaptativos, favoreciendo la angiogénesis, la excesiva proliferación celular, la invasión a nivel tisular y las metástasis, incrementando la morbi-mortalidad del paciente, el tumor que no es capaz de crecer por tiempo indefinido y que no invade tejidos circundantes sanos se denomina benigno. El que prosigue su crecimiento y se vuelve invasor en forma progresiva se denomina maligno.<sup>1</sup>

Actualmente se ha demostrado que esta patología afecta a mujeres en edad reproductiva (20-34 años), constituyendo 12% de los casos de cáncer de mama en este grupo de edad.<sup>2</sup>

El cáncer de mama es la malignidad más común en la población femenina y la tasa de mortalidad se ha incrementado continuamente en los últimos 30 años. En Europa y E.U.A., se diagnostican más de 150, 000 por año de los cuales 50,000 fallecen.<sup>2</sup>

En México es el segundo cáncer en mujeres más frecuente después del carcinoma cervicouterino y constituye la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en nuestro país.<sup>1</sup> En la Clínica de Especialidades de la Mujer se presentan en promedio entre 90 a 100 casos por año durante el último quinquenio.<sup>3</sup>

### Etiopatogenia del cáncer

La patología mamaria es variada y compleja, su importancia clínica se define con base en los síntomas ligados a los diferentes cambios del desarrollo glandular, los cambios propios del embarazo, de la lactancia, y los cambios involutivos durante la menopausia hacen de esta patología un evento multifactorial.<sup>4</sup>

membrane receptor localization in all cells of the hematopoietic system that infiltrate the tumors, except in erythrocytes) was associated with TNM stages in both the glandular portion of the stroma. The IL-10 receptor, showed an inverse association with stromal at TNM stage which agrees with the theoretical basis in this regard published in the literature. The ErbB2, trophic factor related to tissue growth, showed the level of the stromal matrix, an association directly proportional to TNM stage, and statistically significant differences when comparing the TNM2 and TNM4. Estrogen receptors and progesterone receptors, molecules of nuclear localization, showed an association directly proportional to the rate of Bloom-Richardson histological, whose approach to histopathological criteria include the assessment of nuclear pleomorphism or distortion.<sup>50</sup>

**Key words:** Histopathological grade, stage cancer, apoptosis-related receptors, receptors associated with cell proliferation, hormone receptors, receptors for inflammatory and proinflammatory cytokines.

El cáncer de mama, en particular, es una proliferación acelerada y descontrolada de las células de la glándula mamaria. El tipo más frecuente e invasivo es el carcinoma ductal infiltrante.<sup>5</sup> Se ha evidenciado que la adquisición de su capacidad de crecimiento, infiltrativa y metastásica depende de la angiogénesis tanto *in vitro* e *in vivo*.<sup>6</sup> En la etiopatogenia oncológica del cáncer de mama, se han establecido dos fases cronológicas:

1. Prevascular, de larga duración, donde el crecimiento tumoral y el potencial metastásico son limitados.
2. La fase vascular, iniciada con la angiogénesis, caracterizada por un crecimiento tumoral rápido que no va acompañada necesariamente de un alto potencial metastásico.

El aumento de la masa tumoral, la neoformación vascular y el carácter fenestrado de los neovasos favorecen el paso de las células tumorales a la circulación por lo que el éxito de la metástasis depende, en parte, del número de células neoplásicas circulantes en diseminación y su implantación e invasividad de sus características histológicas.<sup>7</sup>

La transdiferenciación es la capacidad celular, de algunos cánceres, de presentar patrones de diferenciación histológica diferente a nivel morfológico y funcional a partir de sus células madre de origen.<sup>8</sup>

Otro fenómeno en el contexto de la etiopatogenia de cáncer es la desregulación negativa de apoptosis, respecto a los puntos de regulación del ciclo celular, las ciclinas D1 (Reguladora de la fase inicial G1/S del ciclo celular) y ciclina DE (Reguladora de la diferenciación y proliferación celular en unión de la CDK4-6 del ciclo celular) fueron completamente establecidas en la respuesta inmune temprana siguiendo el tratamiento con reguladores conocidos de la proliferación incluyendo esteroides y factores de crecimiento mitogénico. Estudios han mostrado que estas ciclinas fueron desreguladas en el cáncer de mama. Las ciclinas y los inhibidores de

cinastas dependientes de ciclinas (CDKs) han mostrado extensivamente ser reguladores del ciclo celular como oncogenes putativos de la mama o genes supresores tumorales así como potenciales marcadores terapéuticos responsables del pronóstico: las ciclinas D1 y E1 y los inhibidores de CDKs p27 (Kip1) p21 (WAF/Cip1) y p16 (INK4A). Otro regulador importante del ciclo celular conocido es el protooncogén c-Myc, que se convierte a oncogén en el contexto del fenómeno proinflamatorio crónico y son líneas de investigación futuras a estudiar en relación con los niveles de expresión de la familia de los TNFs involucrada en la cancerigénesis.<sup>9-11</sup>

### Clasificación TNM

Existe una estrategia de clasificación de los pacientes con cáncer de acuerdo a su pronóstico, llamado sistema TNM, sus parámetros incluyen T que es el tamaño tumoral, el parámetro N que indica la presencia de células tumorales en los nodos linfáticos y M que es la presencia de metástasis celular. Este sistema ha sido aceptado internacionalmente como un factor pronóstico y un indicador del tratamiento médico y quirúrgico; y permite formular decisiones terapéuticas de acuerdo a su categoría, según criterios post-radiológicos y post-quirúrgicos<sup>12</sup> (*Cuadro 1*).

### Clasificación Bloom-Richardson

En este orden de ideas existe una estrategia de clasificación microscópica de nivel histológico llamada Escala de Scarff-Bloom Richardson modificada por Elston, esta escala

ha sido estandarizada en histopatología para la valoración microscópica del carcinoma ductal, toma en cuenta tres criterios:

1. Porcentaje de túbulo formado en las células tumorales.
2. Distorsión nuclear de las células o pleomorfismo.
3. Número de mitosis por diez campos histológicos, la sumatoria de estos criterios asigna una categoría del 1 al 3, y de ellos se saca un promedio que da el grado histológico, cuanto mayor es la categoría asignada la célula tumoral es más indiferenciada con respecto a su tejido original y tendrá peor pronóstico al tratamiento<sup>13</sup> (*Cuadro 2*).

### Función del sistema inmune en el cáncer

La capacidad del sistema inmune para identificar y destruir las células nacientes tumorales y funcionar como una defensa primaria contra el cáncer ha sido estudiada desde hace muchas décadas. Recientes hallazgos en modelos murinos de cáncer, así como de humanos ofrecen ahora evidencia de que los tipos celulares particulares del sistema inmune, las moléculas efectoras del sistema humoral y sus vías de señalización pueden actuar colectivamente como un mecanismo extrínseco de supresión tumoral.<sup>1</sup>

El sistema inmune tiene tres funciones principales en la prevención y respuesta contra las células tumorales.

- **Primero:** El sistema inmune puede proteger en la fase aguda con reacción proinflamatoria (TH1) de virus induc-

**Cuadro 1.** Estadificación TNM para el cáncer de mama de la Join Comité.<sup>2</sup>

| Estadio                       | Descripción                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tumor                         | <p>Tx Tumor primario no valorable.</p> <p>T0 No evidencia de tumor primario.</p> <p>Tis Carcinoma <i>in situ</i>.</p> <p>T1 Tumor hasta 2 cm en su diámetro mayor.</p> <p>T2 Tumor mayor de 2 cm, pero menor de 5 cm en su diámetro mayor.</p> <p>T3 Tumor mayor de 5 cm en su diámetro mayor.</p> <p>T3 Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o piel.</p> |
| Nódulos linfáticos regionales | <p>Nx Nódulos linfáticos regionales no valorables.</p> <p>N0 Sin nódulos linfáticos regionales involucrados.</p> <p>N1 Afección a ganglios linfáticos ipsilaterales móviles.</p> <p>N2 Afección a ganglios ipsilaterales fijos unos a otros o a otras estructuras.</p> <p>N3 Afección a ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales.</p>                                         |
| Metástasis distantes          | <p>Mx No presencia accesible a metástasis distantes.</p> <p>M0 No metástasis distantes.</p> <p>M1 Presencia de metástasis distantes (incluyendo ganglios linfáticos supraclaviculares del mismo lado).</p>                                                                                                                                                                               |

**Cuadro 2.** Clasificación Bloom-Richardson.

| Parámetro histológico                                | Índice asignado |
|------------------------------------------------------|-----------------|
| Porcentaje de formación de túbulo (dentro del tumor) | 1-3             |
| Pleomorfismo o distorsión nuclear                    | 1-3             |
| Conteo mitótico                                      | 1-3             |

tores de tumores o de células cancerosas, eliminando o neutralizando la infección viral y la tumorigénesis.

- **Segundo:** La eliminación del patógeno y la pronta resolución de la inflamación evitan el establecimiento de un microambiente inflamatorio (TH1) crónico benéfico para la tumorigénesis, restableciendo el estado TH2/TH1 en el equilibrio de la salud (fase crónica).
- **Tercero:** El sistema inmune puede identificar específicamente y eliminar las células tumorales con base en la expresión de sus antígenos específicos ya sea a través de reconocimiento antigénico de Patrones Moleculares Antigénicos Asociados a Daño (PMAADs), de Antígenos de Trasplante Específicos de Tumor (ATET) o a Antígenos de Trasplante Relacionados a Tumor (ATRT).<sup>14</sup>

La supervivencia tumoral al sistema inmune consta de tres fases denominadas: eliminación, equilibrio y escape.<sup>15</sup>

- **Fase de eliminación del cáncer:** Es cuando el sistema inmune detecta y elimina correctamente las células tumorales que se han desarrollado como resultado de los mecanismos TH1 de supresión tumoral aguda. Puede ser completa cuando todas las células tumorales se han eliminado, o incompleta cuando sólo una porción de las células tumorales son eliminadas.<sup>15</sup>
- **Fase de equilibrio:** Es aquella en que las células tumorales permanecen en estado de quiescencia en contacto con el sistema inmune constituyendo un equilibrio dinámico TH1/TH2.<sup>15</sup>
- **Fase de escape o supervivencia tumoral.** Es en la cual las células tumorales atenúan los mecanismos inmunosupresores antitumorales de la respuesta fisiológica del huésped permitiendo la progresión y el crecimiento tumoral con la persistencia del estado crónico TH1 en lugar de TH2.<sup>15</sup>

### Rama celular del sistema inmune

Dentro de la rama celular del sistema inmune de la fase de escape los tumores requieren un constante flujo de células mielomonocíticas que soportan la angiogénesis y la remodelación del estroma necesaria para el crecimiento tumoral. Este fenómeno es mediado por el reconocimiento del patrón antigénico tumoral que estimulan la producción de factores humorales específicos para el tumor, los cuales estimulan una mielopoyesis sostenida y la acumulación y diferenciación funcional de las células mielomonocíticas, la mayor parte de las cuales son macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos (CTLs) en el sitio tumoral. Un importante efecto colateral es la acumulación y diferenciación funcional de estas células que puede conllevar, entre otras cosas, a disfunción linfocítica específica del sistema inmune. Se establece un equilibrio entre las células tumorales y las células mielomonocíticas que pueden ofrecer nuevos puntos de intervención terapéutica que depriven a las células neoplásicas de sus factores indispensables de crecimiento y activen la respuesta inmune antitumoral.<sup>16</sup>

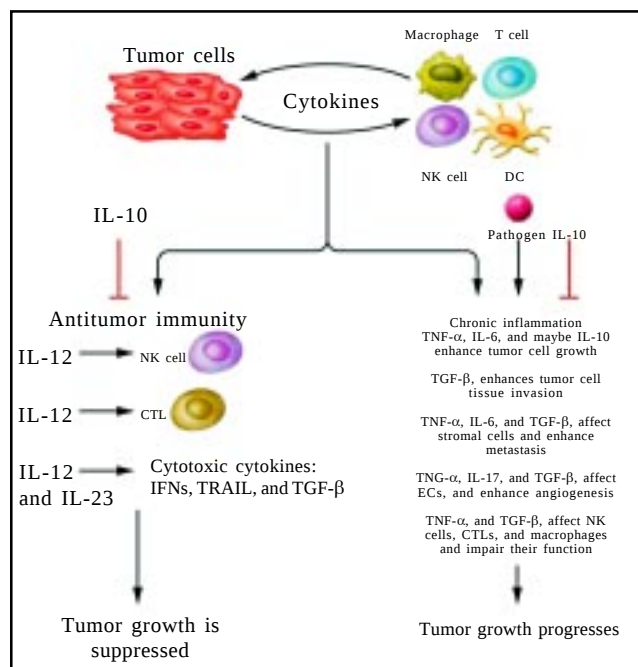
### El TNF- $\alpha$ y su función en el cáncer

El TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) es una proteína de 16 KDa (Kilodaltones), la cual es producida por la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (ECTA), cuya forma soluble consiste en 76 residuos animotermiales, se ha relacionado a la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante y la enfermedad de Chron.<sup>17</sup>

En 1885, Rudolf Virchow, médico ruso que indagó las primeras bases teóricas de la Patología, observó que la presencia de leucocitos en tejidos cancerosos podría tener un efecto relacionado con el cáncer, en el contexto de la inflamación aguda y crónica.<sup>18</sup>

El TNF- $\alpha$  fue descubierto inicialmente debido a su actividad antitumoral potente en la fase aguda de inducción tumoral en modelos animales y es una citocinapleiotrópica crítica para la traslocación celular, el estado inflamatorio agudo, el mantenimiento de la estructura de los órganos linfoides secundarios y la respuesta del huésped contra varios patógenos y células cancerosas. El TNF- $\alpha$  es una citocinapleiotrópica que ha sido descrita por inducir diversos efectos en las células linfoides malignas que expresan receptores para la superfamilia del TNF- $\alpha$ .<sup>19</sup>

El TNF- $\alpha$  junto con la IL-6 y el TGF $\beta$  en su fase de secreción crónica estimulan el crecimiento tumoral permitiendo la penetración de las células estromales, en forma sinérgica la estimulación combinada de TNF- $\alpha$ , IL-17 y TGF $\beta$  estimulan el fenómeno de angiogénesis (*Figura 1*). La acción combinada del



**Figura 1.** El TNF- $\alpha$  promueve la progresión tumoral en la fase crónica inflamatoria, coadyuva la formación de metástasis, y junto con IL-17 y el TGF- $\beta$  favorece el fenómeno de angiogénesis y las funciones de los linfocitos T citotóxicos y las células Natural Killers (NKs).<sup>1</sup> **Fuente:** Wan-Wan L, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation and cancer. Rev Series 2007.



sión tisular (Figura 3); así como del factor de transcripción AP-1 que promueve la traducción de metaloproteinasas y de la cinasa de la Proteína Activadora de Mitosis (MAP) que transduce señales estimulantes de hiperproliferación.<sup>21</sup>

### Receptores de crecimiento y de hormonas esteroideas

El eje endocrino hipotálamo-hipófisis-ovario presenta en su regulación axial la función y producción de hormonas esteroideas, tales como los estrógenos y la progesterona, receptores cognados desde el punto de vista filogenético, y éstos a su vez presentan inter-regulaciones positivas y negativas con los factores de crecimiento epidérmico (entre cuyos miembros se encuentran la familia de los ErbB homo y heterodiméricos, como el ErbB2<sup>8</sup>) con los receptores de folículo, prolactina para la integración del desarrollo funcional de la mama en todas las etapas de la vida de la mujer.<sup>20,22</sup>

La disminución de los receptores de estrógenos son importantes para la remodelación ósea (incluso, la alteración de los receptores estrogénicos y progestágenos pueden conllevar a las metástasis óseas del cáncer de mama. En la actualidad son de utilidad clínica en el tratamiento integral de algunos cánceres de mama el uso de moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM), tales como el raloxifeno por tener efectos benéficos como inhibidor de la proliferación de algunos cánceres mamarios a nivel óseo y otros SERM en la evolución a nivel de los nodos linfáticos. También la función de los receptores de estrógenos en su distribución ubicua en la mujer brinda efectos profilácticos en el sistema cardiovascular y endócrino hepático, siendo parte integral de los sistemas fisiológicos en la mujer.<sup>23</sup>

### Función de los TNFRs en el desarrollo de la glándula mamaria y sistema inmune

La función y presencia del TNF- $\alpha$  y sus receptores TNFR1 y TNFR2 han sido descritas en el desarrollo fisiológico de la glándula mamaria y en todas las células del sistema inmune, excepto en los eritrocitos, a nivel mamario principalmente en las células epiteliales o ductales,<sup>26</sup> por sus funciones en la proliferación celular, apoptosis cíclica y remodelación tisular en las etapas del desarrollo embrionario temprano, durante la fase de lactancia y en el periodo involutivo post-lactancia. Se ha reportado una disminución en los niveles del TNFR1 (relativos a apoptosis) y presencia sostenida del TNFR2 (relativa a proliferación) durante la fase lactante.<sup>25</sup>

### Relación de los TNFRs con los receptores de estrógenos y progesterona

Los niveles de estrógenos también son uno de los factores responsables del crecimiento y la progresión del cáncer mamario en el grupo de mujeres tanto en pre y post-menopausia, ya que posterior a la depleción hormonal de la mujer los adipocitos periféricos funge como la principal fuente de estrógenos circulantes. En la práctica clínica es de uso aceptado los agentes inhibidores de aromatasa debido a que su actividad a nivel del tejido adiposo mamario de sustitución glandular ofrece beneficios exitosos en la inhibición del

crecimiento de los cánceres mamarios con alto índice enzimático de aromatasa. Recientes estudios han revelado que hay una alta expresión de TNFRs a nivel del mismo tejido adiposo mamario post-menopáusico, los cuales modulan una amplia gama de fenómenos como la inflamación tisular crónica, la proliferación celular, y una incrementada tasa de producción del TNF- $\alpha$  principalmente a nivel de las células ductales. Lo anterior sugiere que el TNF- $\alpha$  promueve el crecimiento tumoral desde el nivel estimulación de los adipocitos y fibroblastos periféricos.<sup>26</sup>

A su vez los receptores de progesterona se encuentran relacionados con los TNFRs en vías transcripcionales comunes de proteínas de remodelación epitelial como la mucina 1 (MUC1), con funciones proliferativas en las neoplasias mamarias<sup>27</sup> y ováricas experimentales.<sup>28</sup>

### Función de los TNFRs en el desarrollo del cáncer de mama

Dos fenómenos importantes respecto al desarrollo del cáncer mamario, uno es la alteración en el metabolismo de las metaloproteinasas (a través del factor de transcripción AP-1 citado en la figura 2) y el otro es la función capital de la inflamación crónica en la oncogénesis a través de la activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y MAPK, todos ellos relacionados con la activación patológica de los TNFRs.<sup>21,29</sup> Lo anterior ha sido confirmado en numerosas jornadas experimentales *in vitro* e *in vivo* con uso de anticuerpos específicos anti-TNFRs y técnicas de Biología molecular que certifican la influencia capital de la inflamación en la oncogénesis.<sup>30</sup> Los cuales convergen en la vía de señalización a través del factor TRAF2 como vía común de fosforilación.<sup>31</sup>

Es claro que citocinas proinflamatorias tal como el TNF- $\alpha$  que cumplen funciones importantes orquestando la respuesta inmune contra patógenos virales y bacterianos, cuando presentan patrones de expresión alterados contribuyen en la patogenia de diversas enfermedades con sello inflamatorio incluido el cáncer.<sup>32</sup>

### Función de los estrógenos y progesterona en el cáncer de mama

La importancia de los receptores hormonales en el desarrollo característico de cada tipo celular canceroso responde al perfil hormonal de la línea celular, así como a su manipulación terapéutica bajo este tenor, principalmente en el campo del manejo de procesos metastásicos que brindan la mayor morbi-mortalidad al paciente. Las mayores tasas de supervivencia se obtiene cuando las neoplasias ofrecen blancos hormonales susceptibles de bloquearse.<sup>33</sup> A nivel pronóstico todos los cánceres de mama que presentan positividad a los receptores de estrógenos, de progesterona y a ErbB2<sup>12</sup> presentan una mejor evolución clínica por tener blancos terapéuticos susceptibles de bloquearse.<sup>20,22,23</sup>

Los fármacos antiestrógenos sintéticos representan en la medicina actual un grupo útil de medicamentos, no necesariamente esteroideos, capaces de disminuir la captación específica de los estrógenos tanto *in vitro* como *in vivo* en diversos órganos de modelos experimentales y en el hom-

bre.<sup>34</sup> Los antiprogéstágenos de uso común, como el Glcb Ab-2, son, asimismo, útiles en combinación con los SERM (sustancias inhibidoras de los receptores de estrógenos) por la distribución anatómica común de ambas hormonas a nivel de órganos reproductores en las pacientes con neoplasias ginecológicas.<sup>37</sup>

### Uso actual de ABS anti TNF- $\alpha$ y anti-TNFR2 en medicina

En la actualidad se han hecho numerosas aportaciones en cuanto al uso de anticuerpos *anti-TNF- $\alpha$* , y sus efectos favorables probados en enfermedades inflamatorias crónicas, dentro de los más usados son el infliximab, adalimumab, el certolizumabpegol, etanercept y el bortezumib, empleados para el tratamiento de enfermedades como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, psoriasis, poliarteritis idiopática juvenil y otras enfermedades inflamatorias. En tanto que para el tratamiento de cáncer de mama sólo se han empleado hasta el momento los anticuerpos *anti-ErbB2*.<sup>36</sup>

En la actualidad, los anticuerpos *anti-TNFs* no son usados a nivel terapéutico como un tratamiento aceptado para el cáncer de mama por no haber aceptación generalizada de su riesgo/beneficio terapéutico real a pesar de los estudios básico y clínicos realizados hasta el momento.<sup>37-43</sup>

### Posibles blancos terapéuticos y sus riesgos

La relación etiopatogénica entre las vías de señalización del *TNFR2* y sus tres factores de transcripción comunes (*AP-1*, *MAPK* y *NF $\kappa$ B*) son susceptibles de bloquearse con anticuerpos *anti-TNFR2* como blanco común.<sup>15,18,21</sup> Sin embargo, al bloquear dicho receptor se activa la vía de señalización cruzada a través de *TNFR1*, ya que se ha demostrado que éstos convergen en la misma vía a través del *TRAF2*.<sup>1,21,37,38</sup>

De acuerdo con lo anterior, se podría considerar el estudio completo de los *TNFR2* y *TNFR1* como posibles blancos terapéuticos futuros, en el tratamiento del cáncer de mama, ya que las vías de señalización de ambos receptores confluyen en la inducción de angiogénesis (*AP-1*), mitosis (*MAPK*), y promoción de un microambiente tumoral crónico proinflamatorio (*NF $\kappa$ B*).<sup>44</sup>

Sin embargo, es importante mencionar que en algunos estudios se ha reportado que el uso de la terapia *anti-TNFR* ha inducido el desarrollo de algunos tipos de cáncer como el linfoma y cáncer de piel.<sup>39,41</sup>

Con base en lo anterior, en la actualidad no se cuentan con evidencias contundentes de que el uso de inhibidores del *TNF- $\alpha$*  a largo plazo, pueda aumentar el riesgo de desarrollo de cáncer por lo que sería necesario continuar con estudios futuros para evaluar la relación mecánica entre la sobreexpresión de los *TNFRs*, su desarrollo en la historia natural de la enfermedad cancerosa y sus aplicaciones realmente útiles en la práctica clínica.<sup>37,45-47</sup>

Las acciones del *TNF- $\alpha$*  fueron sometidas a experimentación al inducir sus diversos efectos en las células linfoides malignas con expresión de receptores de la superfamilia del *TNF- $\alpha$*  por Vladimir Jurisic y cols. de la Universidad de Bel-

grado, investigaron los efectos de su administración a diferentes niveles intracelulares en linfocitos B Raji (nombre propio que se aplicó a una línea linfocítica proveniente de pacientes con linfoma de Burkitt), se cuantificó la liberación de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) por citometría de flujo para medir daño tisular, la masa proteínica citosólica total fue determinada por ensayo de sulfonamida B, y la proliferación celular por incorporación de timidina(H3) a la estructura de ADN e inmunomarcaje de las proteínas *TNFR1* y *TNFR2* de la superfamilia de los *TNFs*, encontraron que el *TNF- $\alpha$*  a dosis de 125 y 250 pg/mL indujo significativamente la proliferación celular y que a dosis de 1,000 pg/mL se produjo el fenómeno de apoptosis, también observaron en su estudio que el *TNFR1* está asociado a apoptosis mientras que el *TNFR2* está asociado a proliferación y supervivencia tumoral para esta línea celular.<sup>48</sup>

Por otra parte, continuando con los fenómenos de apoptosis/proliferación relacionada con los receptores del *TNF- $\alpha$*  en células humanas, Rafia Al Almki y cols., de la Universidad de Cambrige, abordaron la cinética de fosforilación dependiente de *TNFRs* en muestras renales con necrosis tubular aguda (NTA) y cáncer renal. Este equipo demostró que en el riñón normal *TNFR1* es expresado en células peritubulares capilares del estroma y en células glomerulares y se localiza en su forma inactiva con la ASK1 (Cinasa 1 Reguladora de Señal de Apoptosis) fosforilada en la serina 967. Biopsias quirúrgicas de cáncer o isquemia renal muestran tanto lesión y proliferación celular tubular y una baja regulación del *TNFR1* y ASK1, así como sobre-expresión del *TNFR2* en las células tubulares que se localizan con la tirosin-cinasa epitelial/endotelial fosforilada (Etk). Exploraron mutaciones selectivas de receptor con técnicas de inmunomarcaje e inmunohibridización y evaluaron la fosforilación de cinasas de receptor específicas para estudiar las respuestas del *TNF- $\alpha$*  *in situ*. Las mutaciones y los cambios de fosforilación específicos de *TNFR1* de la ASK1 en la treonina 845 son indicativos de la activación de la cinasa. Una mutación específica del *TNFR2* que regula negativamente la activación del *TNFR1* en las células glomerulares del estroma disminuye la actividad del *TNFR2* en Etk de células tubulares, e induce la fosforilación de la Etk.<sup>49</sup>

El *TNF- $\alpha$*  en su forma original, a su vez induce la activación del *TNFR2* y Etk, así como de la SK1, pero no regula negativamente la actividad del *TNFR1*. Asimismo, el *TNF- $\alpha$*  y las mutaciones específicas del *TNFR1* disparan la apoptosis de las células tubulares mientras que el mismo *TNF- $\alpha$*  induce en las células tubulares la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PcNA). La activación diferencial de la ASK1 y la Etk por *TNFRs* en biopsias renales de pacientes provee una explicación de los efectos diversos y opuestos del *TNF- $\alpha$*  en distintos sitios y los ensayos *in situ*, proveen una explicación de su señalización. También encontraron que el *TNFR1* fungió como inductor de la apoptosis mientras que el *TNFR2* indujo la proliferación del antígeno nuclear de proliferación nuclear o PcNA.<sup>48</sup>

El TNFR1 recluta señales de la proteína de dominio de muerte celular asociado a TNFR (TRADD) dando paso a la fosforilación del factor 2 asociado a TNFR y al RIP-1 o receptor de proteína interactuante-1.<sup>23</sup> El TNFR2 activado promueve diferentes vías de activación, tales como NF- $\kappa$ B, MAP y AP-1, que intervienen en la adhesión celular, migración, angiogénesis, proliferación y supervivencia celular.<sup>21,40,50</sup>

Carine Chavey y cols., de la Universidad de Montpellier, realizaron un estudio en cáncer de mama en el cual determinaron la presencia de 19 citocinas, tanto del espectro TH1 como TH2. Emplearon citometría de flujo, así como la determinación de algunas células como linfocitos T, linfocitos B y macrófagos por medio de inmunohistoquímica. Dicho estudio fue hecho en 105 muestras de cáncer mamario del Hospital D'Aurelle, Montpellier. Demostraron en sus experimentos hallazgos que correlacionan la expresión de muchas de las citocinas estudiadas con la co-expresión del AP-1, la cual es un regulador de la traducción de citocinas promotoras de angiogénesis tumoral, como el Factor de Crecimiento Epidérmico Endotelial (VEGF) que está directamente relacionado con la neovascularización de las metástasis.<sup>51</sup>

También encontraron que la sobreexpresión de otras proteínas, como la MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos) y MIP-1 $\beta$  (receptor 8 de quimiocina o CD198) están ligadas con la infiltración de macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, con liberación de citocinas TH1 en la fase crónica del tumor.<sup>51</sup>

Asimismo, correlacionaron experimentalmente la expresión elevada de la IL-8 proinflamatoria (TH1) secretada por la rama celular del sistema inmune innato con un alto contenido de macrófagos en el tumor, que en su fase tardía coadyuva a la anergia linfocítica por adolecencia de factores de coestimulación. También la positividad exhibida por el tumor hacia IL-8 incrementa los niveles de neo-vascularización. Finalmente, concluyeron que la MCP-1, MIP-1 $\beta$  y la IL-8 están correlacionadas en forma directa con el componente celular inflamatorio, así como con la agresividad del tumor.<sup>51</sup>

Ignacio García Tuñón y col., de la Universidad de Alcalá, analizaron con técnica inmunohistoquímica y de Western blot 45 carcinomas de mama infiltrativos y 20 carcinomas *in situ*, con el objetivo de caracterizar el patrón de expresión del TNF- $\alpha$  y sus receptores en muestras de cáncer (enfermedad benigna, carcinomas *in situ* y carcinomas infiltrativos) y de comparar estos resultados con aquéllos obtenidos previamente para IL-6, p53 y p21 utilizando las mismas muestras, con la finalidad de dilucidar los efectos de estas citocinas en el equilibrio apoptosis-proliferación.<sup>52</sup>

La inmunoeexpresión del TNF- $\alpha$  y sus receptores fue estudiada por Western Blot e Inmunohistoquímica. El porcentaje de muestras positivas para TNF- $\alpha$  y TNFR2 fue más elevado en carcinomas *in situ* que en enfermedades benignas de la mama y el TNFR2 fue incluso más alto en tumores infiltrantes. El porcentaje de muestras positivas para TNFR1 fue similar en los tres grupos. Estas tres proteínas fueron observadas en la porción citoplasmática, la inmunotinción para TNF- $\alpha$  fue más intensa en los tumores infiltrantes que en los otros

dos grupos y siempre la tinción para ambos receptores fue más alta para carcinomas *in situ* e infiltrantes que para enfermedades benignas de la mama. Comparando los resultados del TNF- $\alpha$  con algunos resultados obtenidos para mtp53(p53mutada), p21 e IL-6 se encontró una asociación entre la expresión de estas cuatro proteínas y el incremento de la malignidad.<sup>52</sup>

El TNF- $\alpha$  es un factor importante en la inducción del cáncer y sus efectos de supervivencia y proliferación celular parecen estar ligados al aumento de la expresión del TNFR2.<sup>17,21,48,52</sup>

La vía pro-apoptótica del TNFR1 podría estar inhibida por la expresión de p21, que a su vez se incrementa en el cáncer alterando los efectos de TNFR1, entre otras citocinas, la IL-6 pueden contribuir a la promoción tumoral. Encontraron que la expresión del TNFR2 parece incrementarse como una función de la lesión y que puede estar asociado a la inhibición de apoptosis y a la proliferación celular tumoral. En este estudio no se realizó correlación entre los niveles de expresión de TNFR1 (TRAF2) y TNFR2 y los estadios TNM y Bloom Richardson.<sup>1,12</sup>

Con base en lo anteriormente mencionado se concluye que el TNFR1 está relacionado con el fenómeno de apoptosis y el TNFR2 está relacionado con el fenómeno de proliferación celular.

## Material y métodos

### Selección de pacientes

Pacientes con cáncer de mama en estadios Birads II a VI, en estudio y tratamiento médico quirúrgico integral del cáncer en la Clínica de Especialidades de la Mujer.

Las muestras se obtuvieron aleatoriamente de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama que se intervinieron en la sala de Ginecología de la Clínica de Especialidades de la Mujer (periodo de septiembre de 2008 a octubre de 2010), de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión; se revisaron los expedientes clínicos, así como los libros quirúrgicos de Patología para obtener los datos especificados en la hoja de recolección de datos.

### Obtención de la muestra

Los tejidos con cáncer mamario diagnosticado por el especialista, se obtuvieron de forma posterior a la intervención quirúrgica. La cantidad de tejido necesaria para la investigación fue de un bloque de parafina con identificación del foco tumoral por el médico patólogo tratante y aplicación de cuatro cortes por foco tumoral.

Los tejidos con cáncer mamario fueron solicitados a la Jefatura del Departamento de Patología de la Clínica de Especialidades de la Mujer.

### Técnica Inmunohistoquímica

El proceso inició a partir de tejidos incluidos en bloques de parafina, se procedió como primer paso al: Desparafinado de las laminillas. Para desparafinar el tejido se

introdujeron las laminillas en el horno de desecación a una temperatura de 80 °C por 10 minutos. Posteriormente se introdujeron los tejidos en xilol a 60% por 5 a 10 minutos, para completar el desparafinado de los tejidos.

Posteriormente para hidratar los tejidos, se pasaron del xilol a 60% a la batería de hidratación, con dos cambios de xilol 3 minutos cada uno, alcohol-xilol, cuatro cambios de etanol al 100, 96, 80 y 70% por 3 minutos cada uno. Se realizó un lavado en agua bidestilada. Posteriormente se introdujeron los tejidos en un recipiente con PBS o amortiguador de pH fisiológico, para hidratarlos. Incubación con avidina y biotina. Bloqueo de la peroxidasa endógena. Se aplicó solución de peróxido de hidrógeno al 6% (peróxido de hidrógeno 6% diluido con metanol 94%) aprox. 20-25  $\mu$ L, en cada uno de los tejidos. Aplicación de los anticuerpos primarios según el mapa de diluciones, en cada uno de los tejidos de cada laminilla, cuidando que no se mezclen las diluciones. La dilución para el anticuerpo primario de TNFR1 fue de 1:100 y del TNFR2 1:150. (Prevía estandarización de la técnica en cuanto a las diluciones). Aplicación de anticuerpo secundario anticonejo policlonal conjugado con biotina (diluido con solución bloqueadora) según el mapa de los tejidos (concentración 1:300). Complejo Avidina-Biotina (Kit Vectasian ABC de Dako). Aplicación del cromógeno Diaminobenzidina o DAB (sc-8766 de Santa Cruz Biotechnology) en cada uno de los tejidos, manteniendo las precauciones debidas, por sus posibles efectos cancerígenos.

Hematoxilina de Mayer (de Laboratorios Merck). Se introdujeron los tejidos en etanol al 70, 80, 96%, dos cambios

de etanol al 100%, etanol-xilol, dos cambios de xileno al 100% 3 a 5 min en cada solución. Montaje de cubreobjetos. Se aplicó resina para tejido (Tissue-Tek O.C.T. 4583 Compound) a las laminillas para cubrir el tejido y colocar el cubreobjeto.

### Análisis de imágenes

Se esperó 30 min antes de hacer valoración histológica y medición de unidades de densidad óptica con el programa zs-300 de la empresa Zeiss y Pascal Axiovert del microscopio confocal Carl Zeiss de la Escuela Médico Militar.

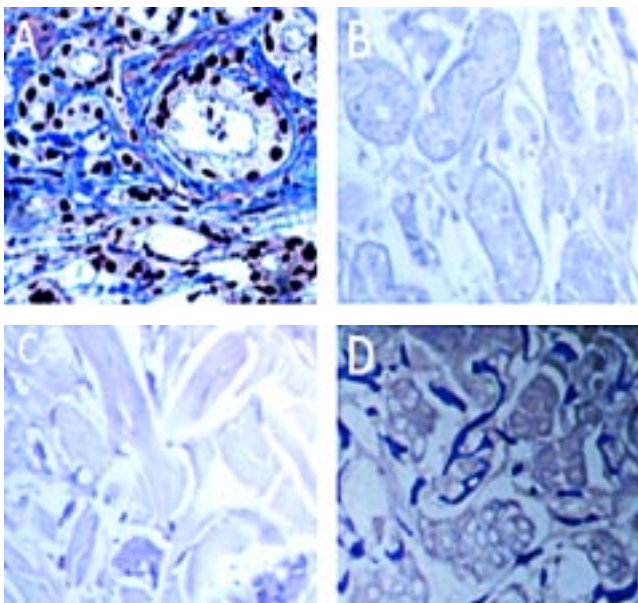
Como control positivo del estudio se utilizó un bloque de tejido embebido en parafina correspondiente a melanoma proveniente del Servicio de Patología del Hospital Central Militar.<sup>43</sup>

En las *figuras 4 a la 15* se muestran imágenes obtenidas de las inmunohistoquímicas del presente estudio.

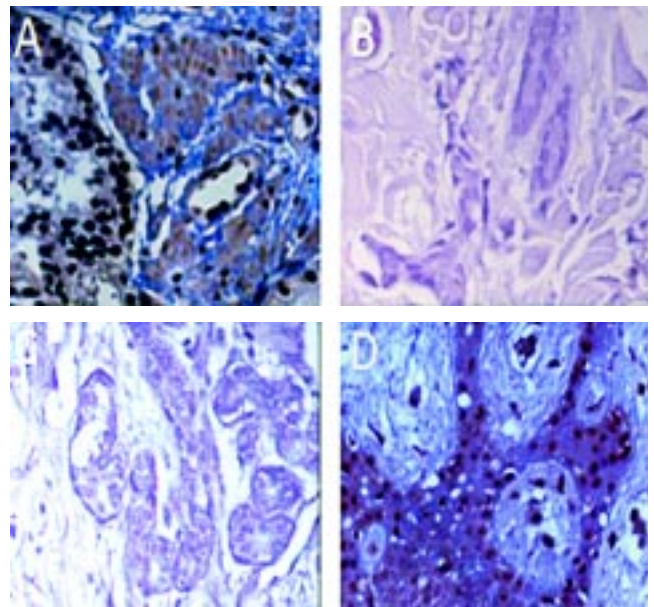
Las tinciones fueron realizadas en el Departamento de Inmunohistoquímica y Biología Molecular de la Escuela Médico Militar y medidas en el microscopio Confocal Carl Zeiss mediante los programas Pascal AxioCam y zs-300 de la Escuela Médico Militar.

### Resultados

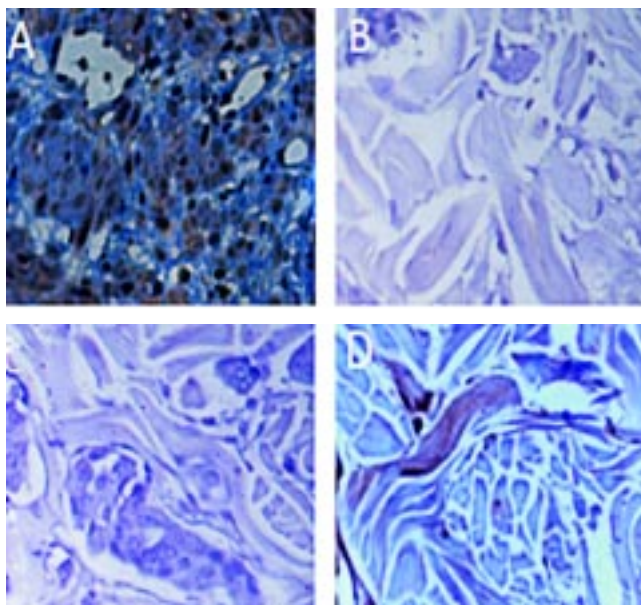
Se observó que la expresión del *TNFR1* no mostró asociación con el estadio TNM ni con el grado de diferenciación celular de Bloom-Richardson. En el estudio inmunohistoquímico de García Tuñón,<sup>4</sup> se analizó la presencia de esta proteína en células de cáncer de mama tanto *in situ* e infiltrantes y se encontró similar presencia del TNFR1 en ambos grupos.



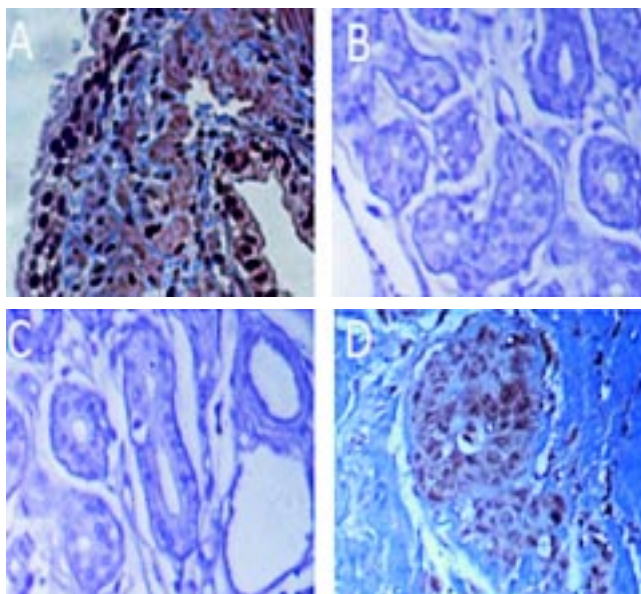
**Figura 4.** Inmunohistoquímica de TNFR1-E en cáncer mamario TNM2. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (14,230 unidades densidad óptica a 40x).



**Figura 5.** Inmunohistoquímica de TNFR1-G en cáncer mamario TNM2. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (28,750 unidades densidad óptica a 40x).



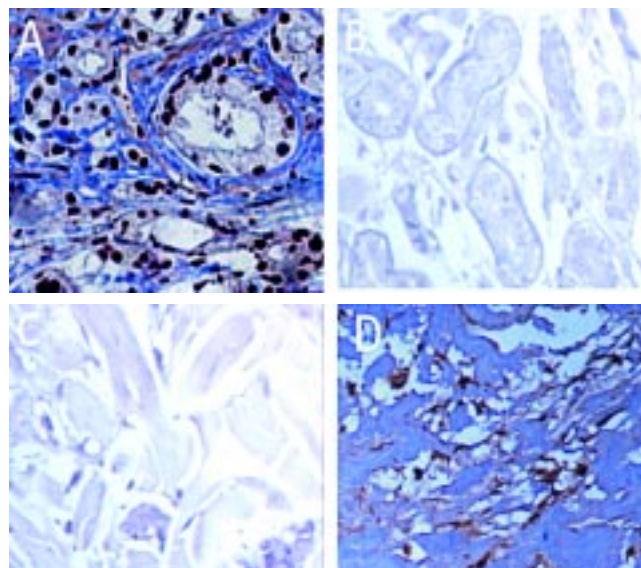
**Figura 6.** Inmunohistoquímica de TNFR2-E en cáncer mamario TNM2. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (13,650 unidades densidad óptica a 40x).



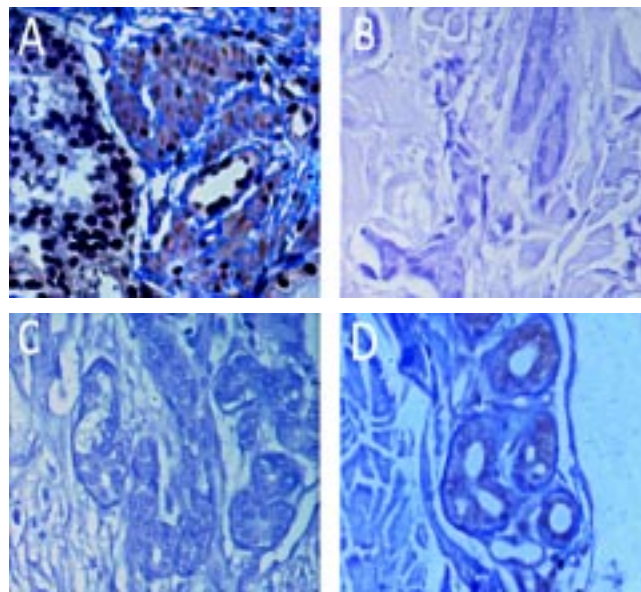
**Figura 7.** Inmunohistoquímica de TNFR2-G N en cáncer mamario TNM2. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (12,980 unidades densidad óptica a 40x).

Lo cual coincide con los hallazgos encontrados en la presente investigación.<sup>1,21,48</sup>

La expresión del *TNFR2* (receptor transmembranal de localización normal en todas las células del sistema hematópoyético que infiltran los tumores, excepto en los eritro-



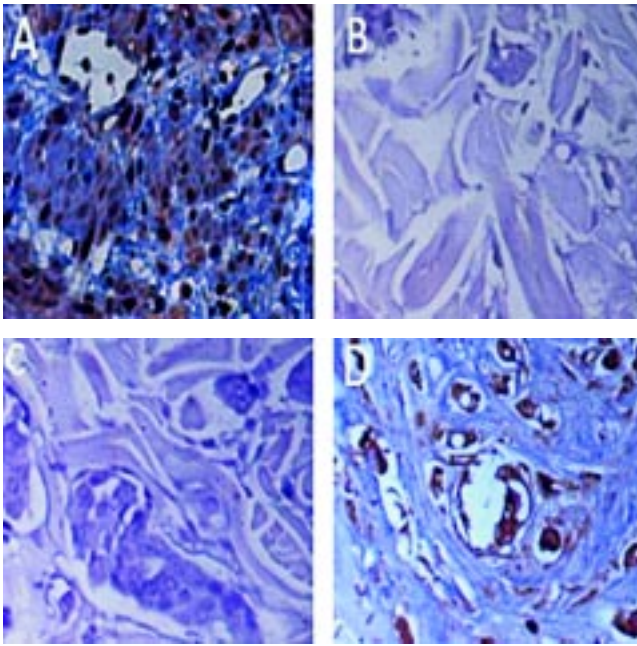
**Figura 8.** Inmunohistoquímica de TNFR1-E en cáncer mamario TNM3. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (13,750 unidades densidad óptica a 40x).



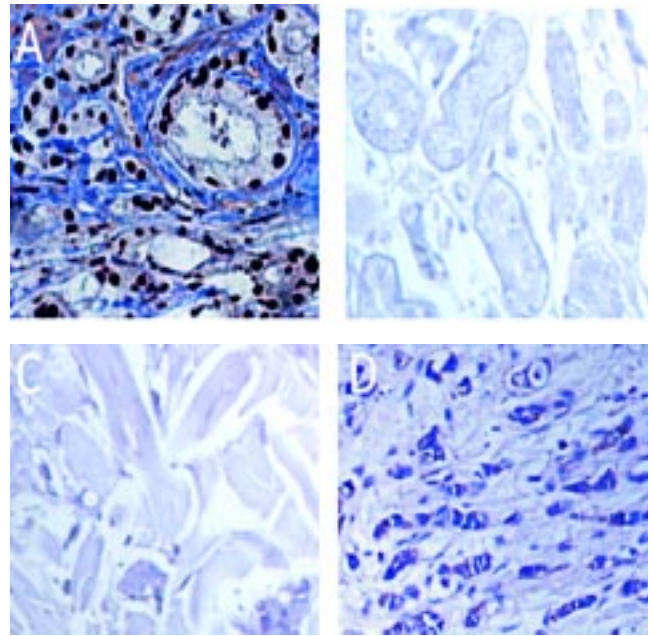
**Figura 9.** Inmunohistoquímica de TNFR1-G en cáncer mamario TNM3. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (12,360 unidades densidad óptica a 40x).

цитos) mostró una asociación con los estadios TNM tanto en la porción glandular como del estroma.<sup>1,21,48,52,53</sup>

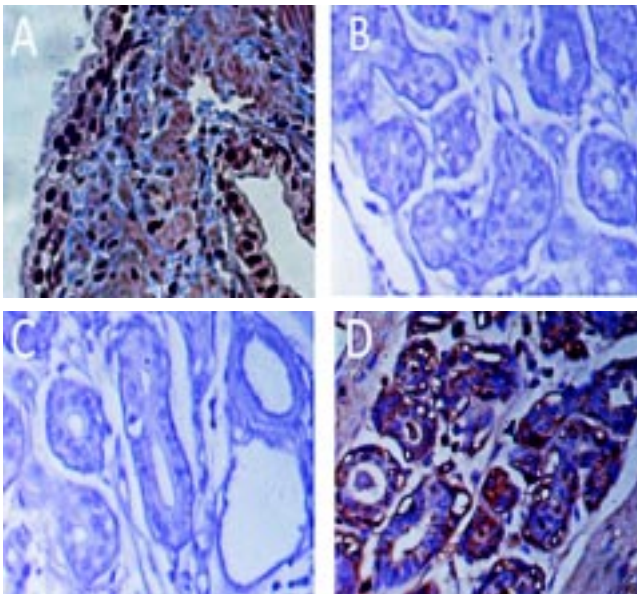
El receptor de *IL-10* presentó una asociación inversamente proporcional a nivel del estroma con el estadio TNM, lo cual concuerda con las bases teóricas al respecto publicadas en la literatura.<sup>38-40</sup>



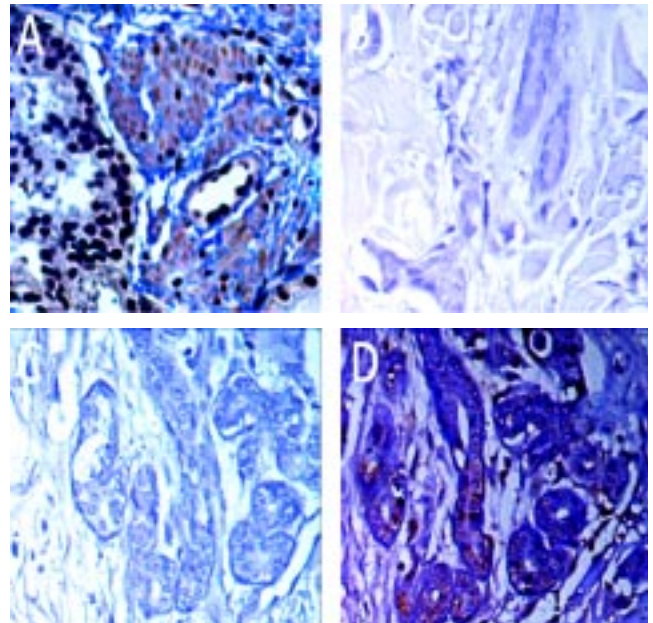
**Figura 10.** Inmunohistoquímica de TNFR2-E en cáncer mamario TNM3. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (23,760 unidades densidad óptica a 40x).



**Figura 12.** Inmunohistoquímica de TNFR1-E en cáncer mamario TNM4. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (6,150 unidades densidad óptica a 40x).



**Figura 11.** Inmunohistoquímica de TNFR2-G en cáncer mamario TNM3. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (47,680 unidades densidad óptica a 40x).

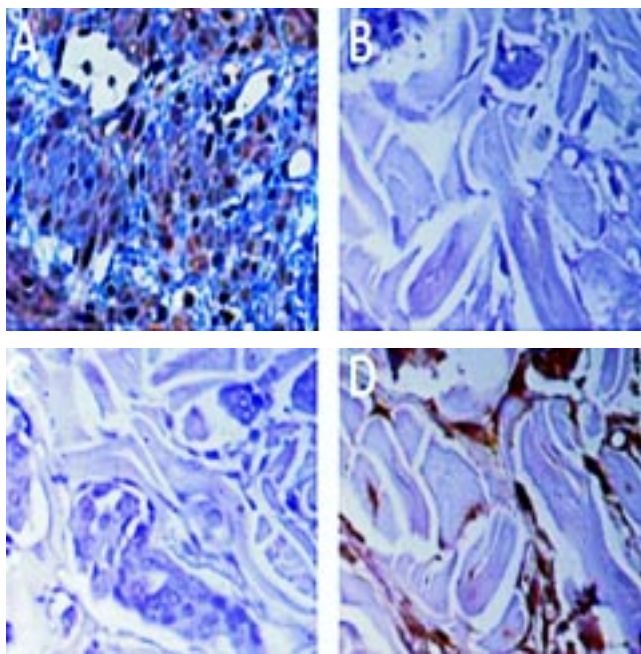


**Figura 13.** Inmunohistoquímica de TNFR1-G en cáncer mamario TNM4. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (20,380 unidades densidad óptica a 40x).

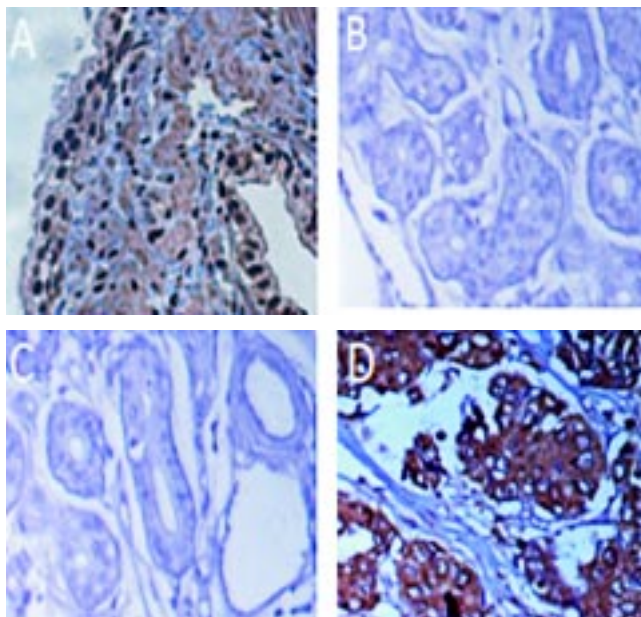
El *ErbB2*, cuya porción transmembranal fue valorada en este estudio, relacionado con los factores tróficos del crecimiento tisular, mostró a nivel de la matriz estromal, una asociación directamente proporcional a estadio TNM, y di-

ferencias estadísticamente significativas al comparar pareadamente los TNM2 y TNM4.<sup>8,54</sup>

Los *receptores de estrógenos y de progesterona*, moléculas de localización nuclear, presentaron una asociación



**Figura 14.** Inmunohistoquímica de TNFR2-E en cáncer mamario TNM4. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (45,590 unidades densidad óptica a 40x).



**Figura 15.** Inmunohistoquímica de TNFR2-G en cáncer mamario TNM4. **A)** Control positivo, melanoma TNM 4. **B)** Control negativo para anticuerpo primario. **C)** Control negativo para anticuerpo secundario. **D)** Tinción problema de carcinoma ductal infiltrante (70,360 unidades densidad óptica a 40x).

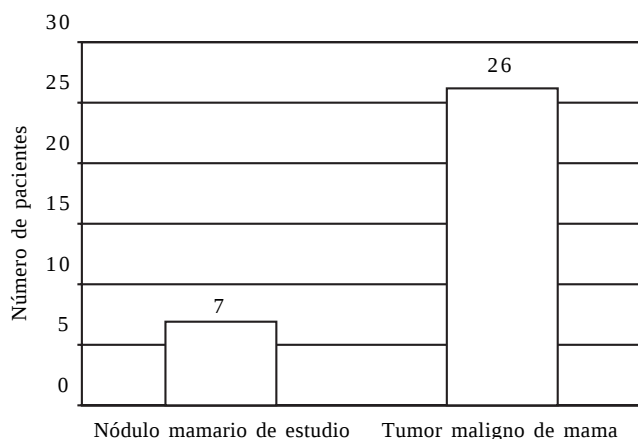
directamente proporcional al índice histológico de Bloom-Richardson, cuyos criterios de abordaje histopatológico incluyen la valoración del pleomorfismo o distorsión nuclear.<sup>55</sup>

Las gráficas correspondientes a los diagnósticos del abordaje inicial hospitalario de las pacientes incluidas en este estudio fueron realizadas con el programa estadístico SPSS 17.0 (Figuras 16-32).

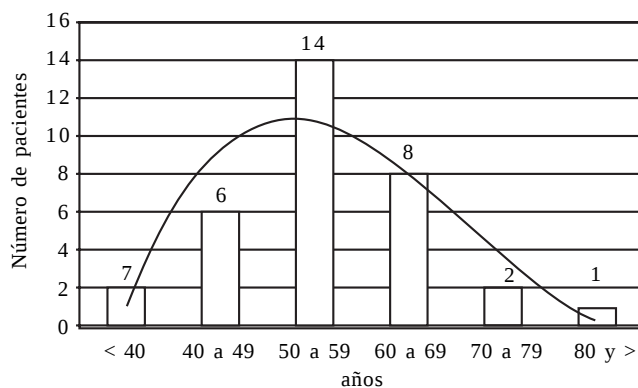
Las 33 biopsias de pacientes con mastectomía radical con diagnóstico de cáncer de mama en diferente estadio TNM (2, 3 y 4), se clasificaron por grupo de edad, el rango con mayor incidencia, fue el constituido por las pacientes entre 50 y 60 años con una  $n = 14$ , tal como se muestra en la figura 17.

Considerando el diagnóstico de egreso, encontramos que el más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante con una  $n = 26$  pacientes, seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante con una  $n = 3$  pacientes y de carcinomas mixtos lobulillar-ductal se tuvo una  $n = 2$ . Asimismo, una paciente con carcinoma ductal con componente papilar y una paciente con carcinoma ductal y componente mucinoso. Se muestra la descripción gráfica en la figura 18.

Considerando el estadio dentro de la clasificación TNM, encontramos que el más frecuente fue el estadio TNM 2



**Figura 16.** El diagnóstico de ingreso con más incidencia fue el de tumor maligno de la mama con una  $n = 26$  seguido por el de nódulo mamario en estudio con una  $n = 7$ .



**Figura 17.** El grupo de edad con más incidencia fue el del rango de edad de 50 a 60 años con una  $n = 14$  seguido por el de 60 a 70 años de edad con una  $n = 8$ .

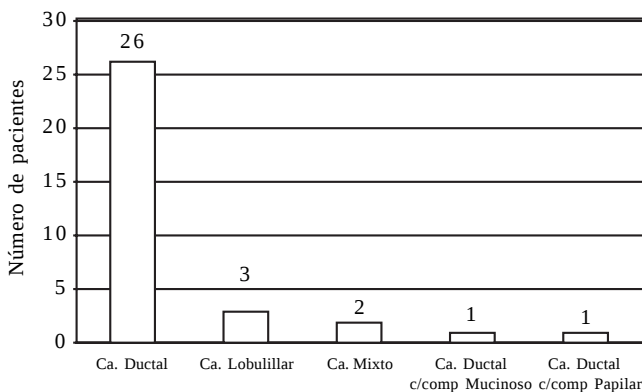
con una  $n = 16$  pacientes seguido del estadio TNM 3 con una  $n = 13$  pacientes y el TNM 4 con una  $n = 4$  pacientes (Figura 19).

En las 29 pacientes con carcinoma ductal (siendo que sólo al carcinoma ductal se le aplica el grado histológico Bloom-Richardson) se clasificó el grado de diferenciación celular empleando este parámetro y se determinó que los grados histológicos más frecuentes fueron el grado 2 (moderadamente diferenciado) y el grado 3 (mal diferenciado), ambos con un  $n = 13$  pacientes cada uno y una  $n = 3$  en grado 1 (bien diferenciado), como se muestra en la figura 20.

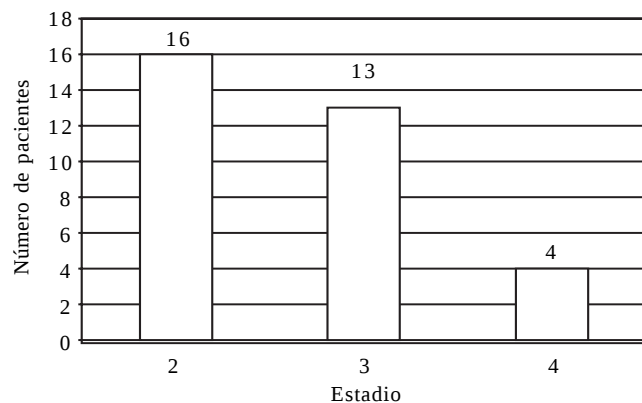
La expresión del TNFR1 en la porción del estroma, se comparó en los diversos estadios TNM 2, 3 y 4, no habiendo encontrado diferencias con significancia estadística en los grupos analizados (Figura 21).

Al comparar la expresión inmunohistoquímica del TNFR1 en la porción glandular en los tres grupos TNM 2, 3 y 4 estudiados mediante una prueba de Kruskal Wallis, se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, como se muestra en la figura 22.

Se grafica la comparación de los tres grupos TNM 2, 3 y 4 estudiados en su expresión inmunohistoquímica del



**Figura 18.** El diagnóstico de egreso más frecuente fue el de carcinoma ductal seguido por el de tres pacientes con carcinoma lobulillar y dos pacientes con carcinoma mixto ductal-lobulillar.

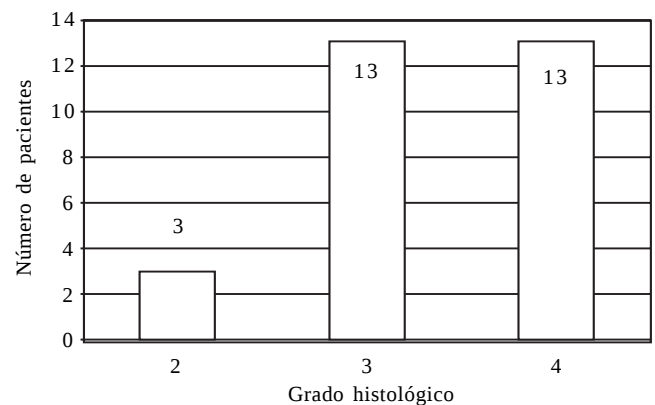


**Figura 19.** El grupo TNM más frecuente fue el TNM2 con 16 pacientes seguido por el TNM3 con 13 pacientes.

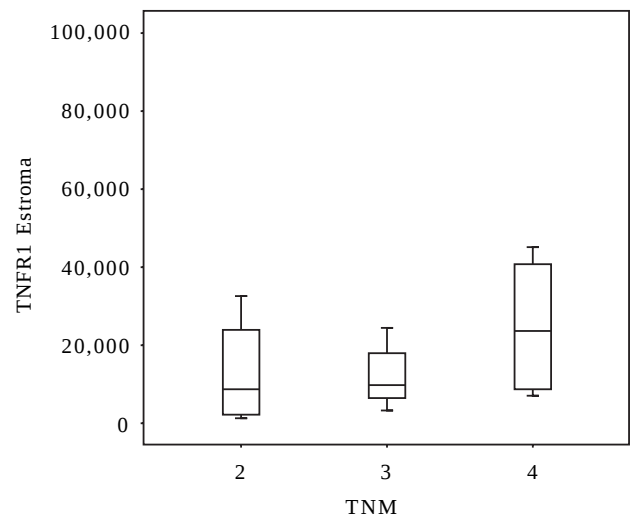
TNFR2 en su porción estromal, al aplicar la prueba de Kruskal Wallis, se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, como se muestra en la figura 23.

Se muestra la comparación de los tres grupos TNM 2, 3 y 4 estudiados en su expresión inmunohistoquímica del TNFR2 en su porción glandular, al aplicar la prueba de Kruskal Wallis, se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, como se muestra en la figura 24.

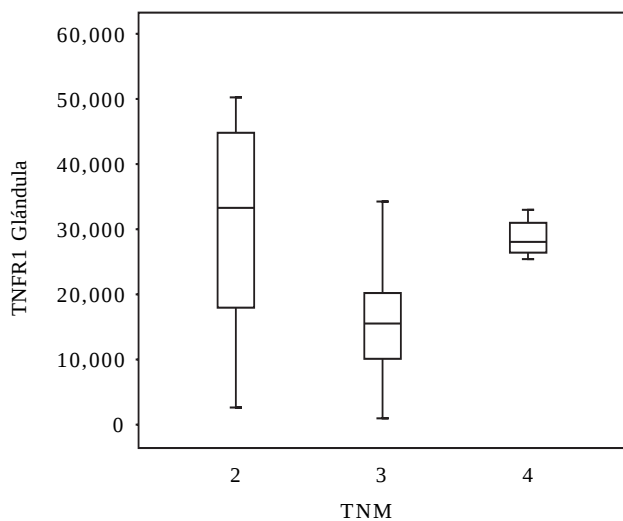
Se grafica la comparación de los tres estadios TNM 2, 3 y 4 estudiados en su expresión inmunohistoquímica del ErbB2 en la porción del estroma, mediante una prueba de Kruskal Wallis, se encontraron diferencias con significancia estadística en los estadios analizados, como se muestra en la figura 25.



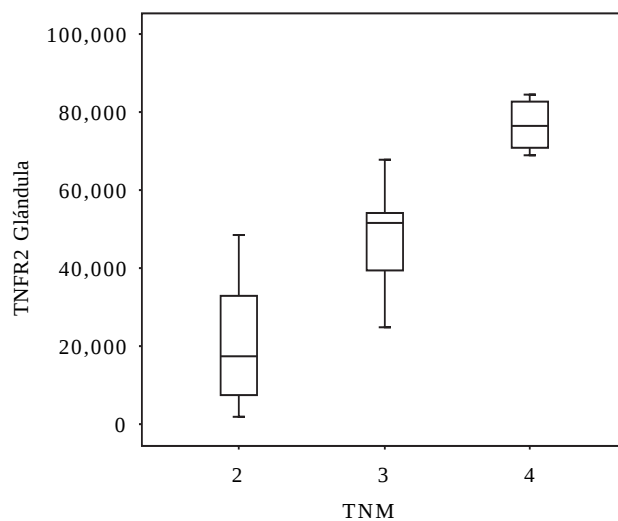
**Figura 20.** Calificación Bloom Richardson ( $N = 29$ ). Los grados Bloom Richardson más frecuentes fueron los grados 2 y 3, con 13 pacientes cada uno, aplicado solamente a las pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal.



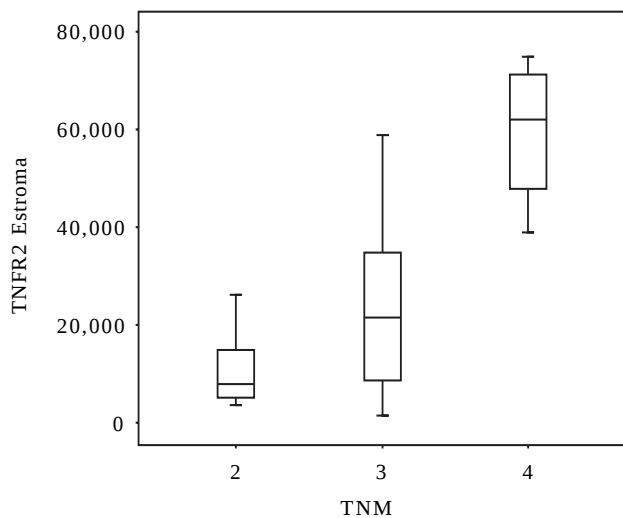
**Figura 21.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de las unidades de densidad óptica en la expresión de TNFR1 en estroma a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.375$ .



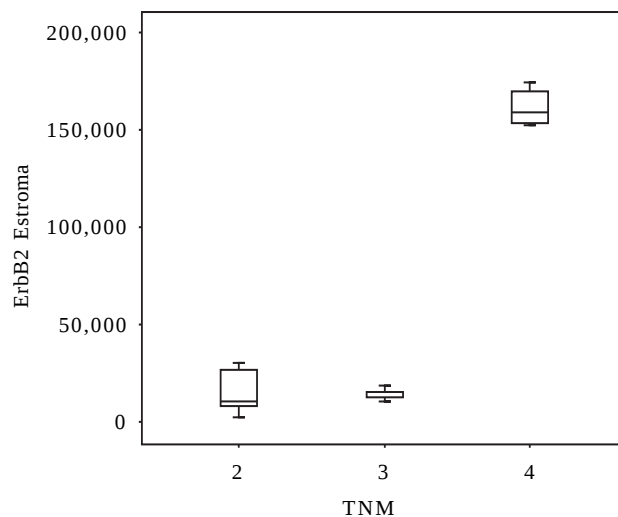
**Figura 22.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de las unidades de densidad óptica en la expresión de TNFR1 en glándula a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.032$ .



**Figura 24.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de las unidades de densidad óptica en la expresión de TNFR2 en estroma a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.0001$ .



**Figura 23.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de las unidades de densidad óptica en la expresión de TNFR2 en estroma a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.001$ .



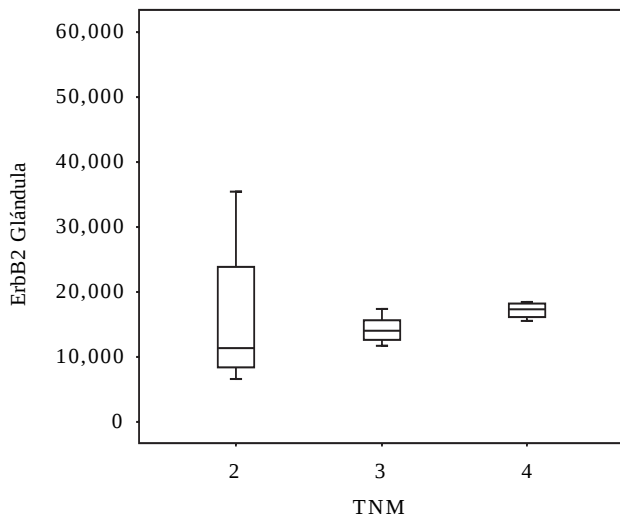
**Figura 25.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de las unidades de densidad óptica en la expresión de ErbB2 en estroma a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.002$ .

Se muestra la comparación de los tres estadios TNM 2, 3 y 4 estudiados en su expresión inmunohistoquímica del ErbB2 en la porción glandular, al aplicar la prueba de Kruskal Wallis no se encontraron diferencias con significancia estadística en los estadios analizados, como se muestra en la *figura 26*.

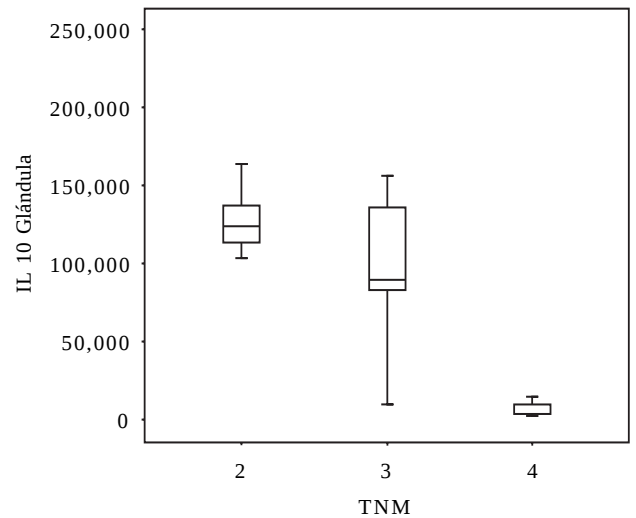
Se graficó la comparación de los tres grupos en estadios TNM 2, 3 y 4 estudiados en su expresión inmunohistoquímica del RxIL-10 en estroma, mediante una prueba de Kruskal Wallis, habiendo encontrado diferencias con significancia estadística en los estadios analizados, como se muestra en la *figura 27*.

También se graficó la comparación de los tres grupos en estadios TNM 2, 3 y 4 estudiados en su expresión inmunohistoquímica del receptor de IL-10 en la porción glandular, mediante una prueba de Kruskal Wallis, habiendo encontrado diferencias con significancia estadística en los estadios analizados, como se muestra en la *figura 28*.

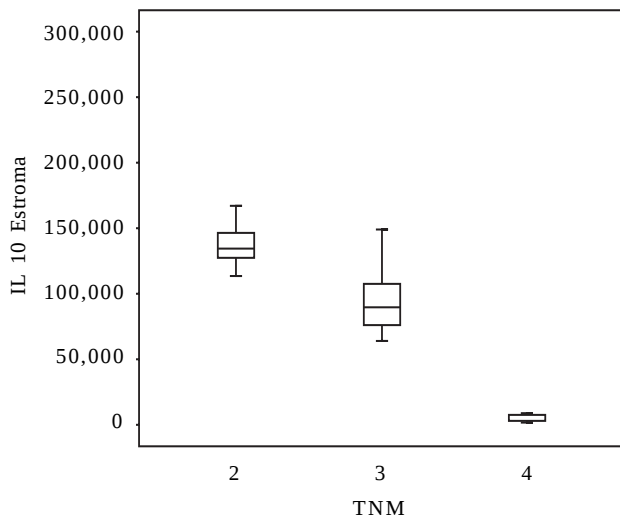
Se muestra la comparación de los tres grupos en estadios TNM 2, 3 y 4 estudiados en su expresión inmunohistoquímica del receptor de progesterona, en este caso con los porcentajes de área obtenidos en los expedientes de Patología, de la Clínica de Especialidades de la Mujer, se



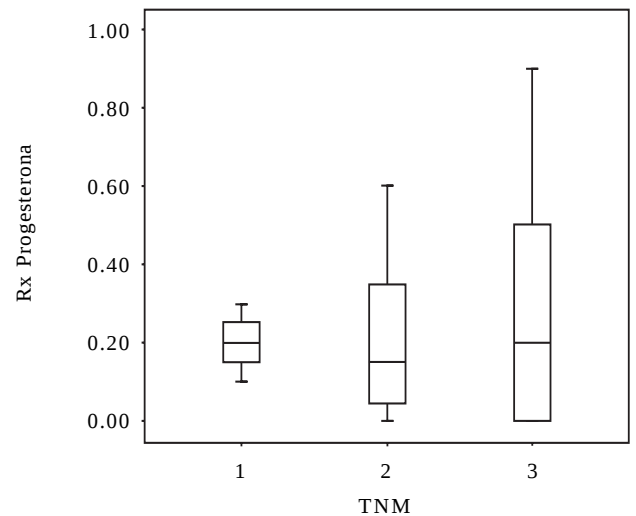
**Figura 26.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de las unidades de densidad óptica en la expresión de ErbB2 en la porción glandular, a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.306$ .



**Figura 28.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de las unidades de densidad óptica en la expresión del receptor de IL-10 en la porción glandular, a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.005$ .



**Figura 27.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de las unidades de densidad óptica en la expresión del receptor de IL-10 en la porción estromal, a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.0001$ .



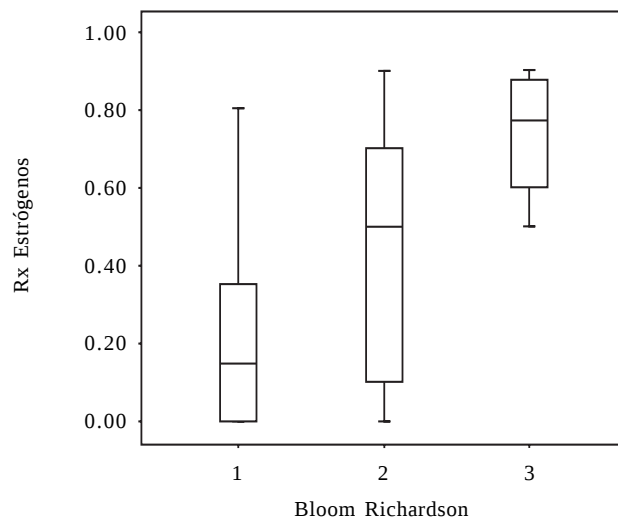
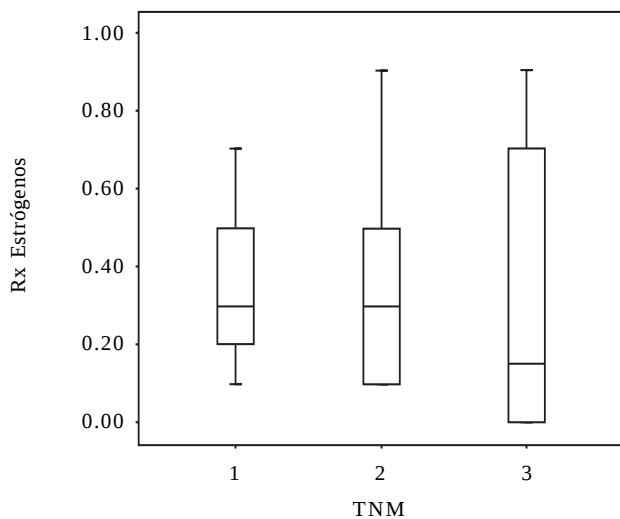
**Figura 29.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de los porcentajes de área en la expresión del receptor de progesterona, a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.982$ .

aplicó una prueba de Kruskal Wallis, no habiendo encontrado diferencias con significancia estadística en los estadios analizados, como se muestra en la *figura 29*.

Además se graficó la comparación de los tres grupos en estadios TNM 2, 3 y 4 estudiados en su expresión inmunohistoquímica del receptor de estrógenos, en este caso con los porcentajes de área obtenidos en los expedientes de Patología, de la Clínica de Especialidades de la Mujer, se aplicó una prueba de Kruskal Wallis, no habiendo encontrado diferencias con significancia estadística en estadios analizados, como se muestra en la *figura 30*.

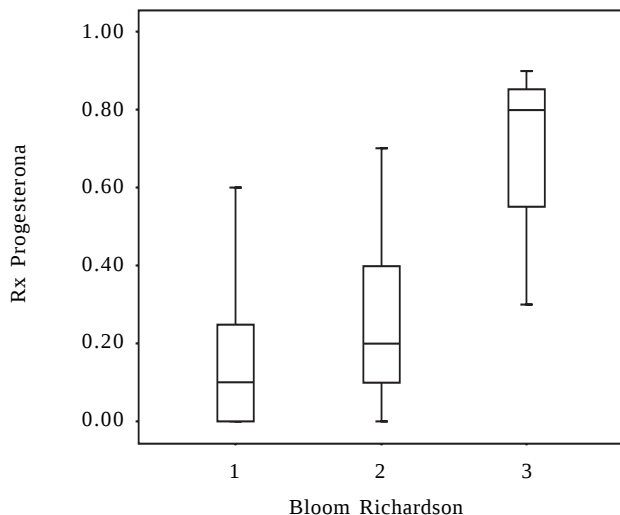
El gráfico de la comparación de la expresión del receptor de progesterona, en este caso en porcentajes de área, obtenidos en los expedientes de Patología, de la Clínica de Especialidades de la Mujer, en relación con los grados histológicos Bloom-Richardson, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, habiendo encontrado diferencias con significancia estadística en los grupos analizados, como se muestra en la *figura 31*.

Se muestra la comparación de los tres grupos con grados histológicos 1, 2 y 3 de Bloom Richardson estudiados en su expresión inmunohistoquímica del Rx. de estrógenos, tam-



**Figura 30.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de los porcentajes de área en la expresión del receptor de estrógeno, a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos en estadios TNM 2, 3 y 4. Con una  $p = 0.877$ .

**Figura 32.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de los porcentajes de área en la expresión del receptor de estrógeno, a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos con grados histológicos 1, 2 y 3 de Bloom Richardson. Con una  $p = 0.030$ .



**Figura 31.** Se muestran valores promedio, errores estándar y desviaciones estándar de los porcentajes de área en la expresión del receptor de progesterona, a través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó la comparación de los grupos con grados histológicos 1, 2 y 3 de Bloom Richardson. Con una  $p = 0.007$ .

bién en porcentajes de área, se aplicó una prueba de Kruskal Wallis, habiendo encontrado diferencias con significancia estadística en los grupos analizados, como se muestra en la figura 32.

En el cuadro 3 se presentan los resultados de la prueba de Kruskal Wallis, algunos de los cuales fueron anteriormente graficados. Se presentan ambos parámetros de agrupación TNM y Bloom Richardson, citados en los objetivos específicos y en rojo las ps de los grupos con diferencias estadísticamente significativas.

Los marcadores que mostraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los esta-

**Cuadro 3.** Prueba de Kruskal Wallis.

| Variable  | TNM    | Bloom Richardson |
|-----------|--------|------------------|
| TNFR1-E   | 0.375  | 0.527            |
| TNFR1-G   | 0.032  | 0.133            |
| TNFR2-E   | 0.001  | 0.479            |
| TNFR2-G   | 0.0001 | 0.541            |
| ErbB2-E   | 0.002  | 0.986            |
| ErbB2-G   | 0.306  | 0.674            |
| RxIL-10-E | 0.0001 | 0.694            |
| RxIL-10-G | 0.005  | 0.553            |
| RxP       | 0.982  | 0.007            |
| RxE       | 0.877  | 0.030            |

dios TNM fueron TNFR1 en estroma, TNFR2 en la porción de predominancia glandular, el Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (ErbB2) en estroma, así como el receptor de la IL-10 tanto a nivel de estroma como glandular.

Los marcadores que mostraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los grados histológicos Bloom Richardson fueron los receptores de estrógenos y de progesterona.

En el cuadro 4 se presentan los resultados de la prueba de U de Mann-Whitney, aplicada entre los estadios TNM o grupos histológicos Bloom Richardson que presentaron diferencias estadísticamente significativas en la prueba previa de Kruskal Wallis.

La prueba U de Mann-Whitney presentó los siguientes hallazgos: Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos TNM 2 y TNM3, TNM3 y TNM4, así como entre los grupos TNM2 y TNM4 a nivel del marcador TNFR2-E (estromal), también a nivel del marcador TNFR2-

**Cuadro 4.** Prueba U de Mann-Whitney.

| Variable  | TNM2 vs. TNM3 | TNM3 vs. TNM4 | TNM4 vs. TNM2 |
|-----------|---------------|---------------|---------------|
| TNFR1-E   | 0.5836        | 0.1264        | 0.2021        |
| TNFR1-G   | 0.1494        | 0.1006        | 0.8133        |
| TNFR2-E   | 0.0299        | 0.0077        | 0.00291       |
| TNFR2-G   | 0.947         | 0.1089        | 0.0130        |
| ErbB2-E   | 0.7618        | 0.1177        | 0.0450        |
| ErbB2-G   | 0.7562        | 0.0926        | 0.1480        |
| RxIL-10-E | 0.1089        | 0.0256        | 0.0032        |
| RxIL-10-G | 0.3110        | 0.0292        | 0.0034        |

**Cuadro 5.** Prueba U de Mann-Whitney.

| Variable | Bloom<br>Richardson 1 y 2 | Bloom<br>Richardson 2 y 3 | Bloom<br>Richardson 1 y 3 |
|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| RxP      | 0.00367                   | 0.0001                    | 0.0007                    |
| RxE      | 0.0089                    | 0.005                     | 0.0001                    |

G (glandular) entre los grupos TNM2 y TNM4, así como a nivel del marcador ErbB2 a nivel estromal entre los grupos TNM2 y TNM4.

El Receptor de la IL-10 presentó diferencias estadísticamente significativas en la prueba U de Mann-Whitney tanto a nivel de estroma como glandular entre los estadios TNM3 y TNM4, así como entre los estadios TNM2 y TNM4. Se aplicó la prueba U de Mann-Whitney a los Rx. de progesterona y de estrógenos, guiados por la prueba de Kruskal Wallis y se encontró diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos, con la  $p = 0.0001$  más baja presentada entre los grados 2 y 3 a nivel de los receptores de progesterona y entre los estadios 1 y 3 relacionado a estrógenos (*Cuadro 5*).

En el *cuadro 6* se muestran los resultados de la prueba de correlación de Spearman aplicada a las muestras analizadas agrupadas por parámetros de estudio:

El análisis de correlación de Spearman brindó cinco correlaciones con una  $p$  menor a 0.05, en los casos siguientes:

- El marcador TNFR2-E mostró una correlación moderada directamente proporcional de 0.610 con una  $p = 0.0001$  en relación con los grupos de la clasificación TNM.
- El marcador TNFR2-G mostró una correlación moderada de 0.758 directamente proporcional al estadio TNM con una  $p = 0.0001$ .
- El marcador ErbB2 mostró una correlación moderada directamente proporcional al TNM de 0.640 con una  $p = 0.0001$ .
- El marcador Rx de IL-10 mostró una correlación moderada inversamente proporcional al TNM de -0.749 con una  $p = 0.0001$ .
- El marcador Rx de progesterona brindó una correlación moderada directamente proporcional al grado histológico Bloom Richardson con una  $p = 0.0001$ .

**Cuadro 6.** Correlación de Spearman.

| Variable  | TNM    | Bloom Richardson |
|-----------|--------|------------------|
| TNFR1-E   | 0.157  | -0.147           |
|           | 0.382  | 0.414            |
| TNFR1-G   | -0.234 | 0.447            |
|           | 0.190  | .009             |
| TNFR2-E   | 0.610  | 0.145            |
|           | 0.0001 | 0.421            |
| TNFR2-G   | 0.758  | 0.19             |
|           | 0.0001 | 0.918            |
| ErbB2-E   | 0.640  | 0.152            |
|           | 0.0001 | 0.397            |
| ErbB2-G   | 0.134  | 0.102            |
|           | 0.456  | 0.574            |
| RxIL-10-E | -0.749 | 0.142            |
|           | 0.0001 | 0.431            |
| RxIL-10-G | -0.500 | 0.050            |
|           | 0.003  | 0.784            |
| RxP       | 0.034  | 0.607            |
|           | 0.853  | 0.0001           |
| RxE       | 0.161  | 0.472            |
|           | 0.371  | 0.006            |

## Discusión

Se observó que la expresión del *TNFR1* no mostró asociación con el estadio TNM ni con el grado de diferenciación celular de Bloom-Richardson. En el estudio inmunohistoquímico de García Tuñón,<sup>52</sup> mencionado anteriormente, se analizó la presencia de esta proteína en células de cáncer de mama tanto *in situ* e infiltrantes y se encontró similar presencia del TNFR1 en ambos grupos. Lo cual converge con los hallazgos encontrados en la presente investigación. El TNFR1 es un receptor transmembranal que ha sido relacionado con

numerosos estudios con la apoptosis cíclica de todas las células del cuerpo (por su localización ubicua) aunque la vía de señalización intracelular converge con la del TNFR2 a través del TRAF2.<sup>1,21,44,54</sup>

La expresión del *TNFR2* (receptor transmembranal de localización normal en todas las células del sistema hematopoyético que infiltran los tumores, excepto en los eritrocitos) mostró una asociación con los estadios TNM tanto en la porción glandular como del estroma, con base en el estudio de García Tuñón, se afirma su relación con el fenómeno de hiperproliferación celular de las células tumorales en los estados alterados del proceso oncológico e igualmente mostró en este estudio, como lo reporta la literatura una presencia mayor en los tumores con peor pronóstico clínico que en los tumores de mejor evolución.<sup>1,21,48,51,54</sup>

El receptor de *IL-10*, molécula emblemática de la respuesta antiinflamatoria aguda y crónica del sistema inmune ante las reacciones propias de estrés infeccioso y oncológico<sup>56</sup> (íntimamente relacionadas en el contexto de la cronicidad), presentó una asociación inversamente proporcional a nivel del estroma con el estadio TNM lo cual concuerda con las bases teóricas al respecto publicadas en la literatura.<sup>38-40</sup>

El *ErbB2*, cuya porción transmembranal fue valorada en este estudio, relacionado con los factores tróficos del crecimiento tisular, mostró a nivel de la matriz estromal, una asociación directamente proporcional a estadio TNM, y diferencias estadísticamente significativas al comparar pareadamente los TNM2 y TNM4, tal como está reportado extensivamente, en la literatura se describe que aumenta directamente proporcional conforma aumenta el estadio de la enfermedad y que su incremento a nivel celular empeora el pronóstico y respuesta al tratamiento oncológico integral.<sup>8,54</sup>

Los receptores de estrógenos y de progesterona, moléculas de localización nuclear, presentaron una asociación directamente proporcional al índice histológico de Bloom-Richardson, cuyos criterios de abordaje histopatológico incluyen la valoración del pleomorfismo o distorsión nuclear, lo cual influye directamente sobre los receptores y moléculas relacionadas con el núcleo de la célula evaluada, lo cual es concordante con las asociaciones reportadas en el estudio inmunohistoquímico de estos dos receptores con el estadio TNM en un estudio reciente de los Dres. Bermúdez y Parada del Hospital Vargas de Caracas.<sup>55</sup>

A continuación se muestran las figuras correspondientes a los diagnósticos del abordaje inicial hospitalario de la pacientes incluidas en este estudio, las siguientes figuras fueron realizadas con el programa estadístico SPSS 17.0:

## Conclusiones

- El TNFR1 presentó una asociación con la clasificación TNM en la porción glandular, no en la porción estromal ni con la escala Bloom-Richardson.

- El TNFR2 tuvo una asociación directamente proporcional con los estadios TNM, no así con el grado histológico Bloom-Richardson.
- El receptor de *IL-10* mostró una asociación inversamente proporcional con el TNM a nivel de estroma no así con la porción glandular ni con el grado histológico Bloom-Richardson.
- El *ErbB2* registró una asociación directamente proporcional con el TNM a nivel del estroma, no así con la porción glandular, ni con el grado histológico Bloom-Richardson.
- Los receptores de estrógenos y de progesterona, no presentaron una asociación directamente proporcional con los estadios TNM, pero se asociaron en las pruebas de comparación pareada y de correlación con la escala de Bloom-Richardson, en forma moderada.

## Referencias

1. Wan-Wan L, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation and cancer. *Rev Series* 2007; 117(5): 1175-83.
2. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Frielander M. Breast cancer in Young women and its impact on reproductive function. *Hum Reprod Updat* 2009; 15(3): 323-39.
3. INEGI, Manual Mujeres y Hombres en México 2009., decimotercera Edición. México. <http://www.inegi.gob.mx> (Última visita: Abril de 2010).
4. Arthritis and Rheumatism 2009; 60: 3180-9.
5. Archivo Clínico de la Clínica de Especialidades de la Mujer (última visita Abril de 2010).
6. Elías S, Contreras A, Llanque C. Cáncer o carcinoma de mama. *Rev Pacea Med Fam* 2008; 5(7): 14-23.
7. Hongjuan Z, Langerod A, Youngran J, Nowels KW, Nesland JM, Tibshirani R, Bukholm IK, et al. Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Molecular Biology of the Cell* 2004; 5: 1-46.
8. Torres GFJ, Torres OFJ. Estudio comparativo de diferentes métodos de valoración de la angiogénesis en el carcinoma ductal infiltrante de mama. *Rev Esp de Patol* 2006; 19(2): 1-9.
9. Zhang Q, Fan Hanil, Shen J, Hoffman RM, Xing HS. Human breast cancer cell lines co-express neuronal, epithelial and melanocytic differentiation markers in vivo and in vitro. *Plos One* 2010; 5(3): 1-7.
10. Caldón E, Daly R, Sutherland RL, Musgrove EA. Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2006; 97: 261-74.
11. King BL, Love SM, Rochman S, Kim JA. The Fourth International Symposium on the intraductal approach to breast cancer. Santa Barbara, California. *Breast Cancer Research* 2005; 7(5): 198-204.
12. Swann JB, Smyth M. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1137-46.
13. American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer Staging Manual*. 7th. Ed. 2002; 2: 43-9.
14. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, Nicholson RI, Griffiths K. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1982; 45: 361-7.
15. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *Rev Series* 2007; 117(5): 1155-66.
16. Waterston A, Bower M. TNF and cancer: good or bad. *Cancer Therapy* 2004; 2: 131-48.
17. Abbasi YA, Rehn M, Ekman N, Alitalo K, Vuori K. PI 130<sup>Cas</sup> Couples the tyrosine kinase Bmx/Etk with regulation of the actin cytoskeleton and cell migration. *J Biol Chem* 1976; 278: 3536-43.
18. Grivennikov IS, Tumanov AV, Ryffel B, Kuprash DV, Shakhov AN, Murakami T, Drutskaya LN, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and Macrophages/ neutro-

phils: protective and deleterious effects. *Immunity* 2005; 22: 93-104.

18. Balkwill F. Tumor necrosis factor and cancer. *Nat Rev Can* 2009; 9: 361-71.

19. Sheti G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: A master switch for inflammation to cancer. *Frontiers in Bioscience* 2008; 1(13): 5094-107.

20. Berek JS, Adashi EY, Hillard P. Enfermedad mamaria e influencias hormonales. *Ginecología de Novak* 1996; 12a. Ed. Mc-Graw Hill Interamericana; 18: 525-39.

21. Wu Y, Zhou BP. TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ B/Snail signaling pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Can* 2010; 102: 639-44.

22. Xiuhua G, Zafar N. Role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2002; 4: 182-6.

23. Moshin S, Weiss H, Havighurst T, Clark G, Berardo M, Roanh L, Qian Z, et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Modern Pathology* 2004; 17: 1545-54.

24. Mammary Gland Development Database. Expression of receptors and signal transduction molecules during mammary gland development. Fuente: dh5@holyrrod.ed.ac.uk. Fecha de última consulta: 28-Enero-11.

25. Varela LM, Ip MM. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a multifunctional regulator of mammary gland development. *Endocrinology* 1996; 137: 4915-24.

26. Santanu D, Sanober A, Ayse C, Mehmet B, Takashi S, Hironobu S, Serdar B. Estrogenreceptors expression of Tumor Necrosis Factor receptors in breast adipose fibroblast. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004; 89(8): 4018-24.

27. Neeraja D, Peng W, Carson D. Cytokine and progesterone receptor interplay in the regulation of MUC1 gene expression. *Molecular Endocrinology* 2009; 24(12): 2253-66.

28. Mizuho N, Noboru M, Naoko I, Toshikatsu M, Miyamoto H. Changes in the expression of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNFR and TNFR-associated Factor in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *Biol Reprod* 2003; 68: 530-35.

29. Bissel M, Hillard J. Inflamla PV. Inflammation and breast cancer. Metalloproteinases as common effector. *Breast Cancer Research* 2008; 10(2): 1-17.

30. Rivas MA, Carnevale RP, Proietti CJ, Beguelin W, Charreau EH, Frahm I, Sapia S, et al. TNF  $\alpha$  acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/p44 MAPK, JNK Akt and NF $\kappa$ B dependent pathways. *Exp Cell Res* 2008; 314(3): 509-29.

31. Grech A, gardman S, Chan T, Quinn R, González R, Basten A and Brinks R. Tumor necrosis factor receptor 2 (TRAF2) signaling is negatively regulated by a novel carboxyterminal TNFR associated factor 2 binding site. *J Biol Chem* 2005; 280(36): 31572-81.

32. Masmudur MR, Lucas A, McFadden G. Viral TNF inhibitors as potential therapeutics. Fuente: Madame Curie BiosciencieDatabase. Austin Tx. Fecha de última consulta: 28-Enero-2011.

33. Gelbish G, Davidson AL, Kopel S, Schreiberman B, Degenshein GA, Burton L, Cunningham J. Relationship of estrogen and progesterone receptors to prognosis in breast cancer. *Ann Surg* 1998; 5: 75-81.

34. Calaf G, Ramirez G, Jordan C. Acción de estrógenos y antiestrógenos en el cáncer mamario. Algunos aspectos básicos. *INC*. 31(3): 82-91.

35. Fisher Scientific Catalog. Anti-progestin Glcb Ab-2, polyclonal. Thermo Scientific, Pierce. Fecha de última consulta: 28-Ene-2011.

36. ChihLi L, Jen KL. Curcumin: a potential cancer chemopreventive agent through suppressing NF $\kappa$ B signaling. *J Can Molec* 2008; 4(1): 11-16.

37. Loreto C. Terapias anti-TNF y neoplasias. *Elsevier Reumatol Clin* 2010; 6(2): 102-5.

38. Williams GM. Antitumor necrosis factor alpha therapy and potential cancer inhibition. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17(2): 169-77.

39. Valdivia SJE, Franco BJ, Silva AL, Pont GD, Soldevilla G, Meza I, García ZEA. Effect of proinflammatorycytokine stimulation

on human breast cancer: Implications of chemokine receptor expression in cancer metástasis. *Cancer Letters* 2009; 28(2): 176-85.

40. Van Hossen R, Timo LM, Ten Hagen M, Eggermont A. TNF- $\alpha$  in cancer treatment: Molecular insights antitumor effects, and clinical utility. *The Oncologist* 2006; 11: 397-408.

41. Smith MRS, Kung H, Durum SK, Colburn SH, Sun Y. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF- $\alpha$  receptor on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* 1997; 9(10): 770-80.

42. Madhusudan S, Foster M, Muthuramalingam SR, Wilner JP, et al. A Phase II Study of Etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6528-34.

43. Leek RD, Landers R, Fox SB, Harris AL, Lewis CE. Association of tumor necrosis factor alpha and its receptors with tyrosine phosphatase expression in invasive breast carcinoma. *British J Can* 1998; 77(12): 2246-51.

44. Naugler WE, Karin M. NF $\kappa$ B and cancer. Identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18(1): 19-26.

45. Scherbakov AM, Lobanova YS, Shatskaya VA, Krasilnikov MA. The breast cancer cells response to chronic hypoxia involves the opposite regulation of NF $\kappa$ B and estrogen receptors signaling. *Steroids* 2009; 74(6): 535-42.

46. Geborek P, Bladstrom A, Turesson C, Gulfe, Petersson IF, Saxne T, Olsson H, Jacobsson LTH. Tumour necrosis factor blockers do not increase overall tumour risk in patients with rheumatoid arthritis, but may be associated with an increased risk of lymphomas. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 699-703.

47. Askling J, Ronald F, Van Vollenhoven, Granath F, Raaschou P, Forde M, et al. Cancer risk in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-Tumor Necrosis Factor therapies.

48. Jurissic V, Bogdanovic G, Kojic V, Jakimov D, Sedie T. Effect of TNF- $\beta$  on Raji cells at different cellular estimated by various methods. *Ann Hemat* 2006; 85: 86-94.

49. Al Amki R, Wang J, Vandamabeele P, Bradley A, Thiru S, Lou D, Wang M, et al. TNFR1 and TNFR2-mediated signaling pathways in human kidney are cell type specific and differentially contribute to renal injury. *The FASEB Journal* 2009; 19: 1637-45.

50. Jones SJ, Ledgerwood E, Prins JB, Galbraith J, Johnson DR, Pober JS, Bradley J. TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNFR1. *J Immunol* 1999; 162: 1042-8.

51. Chavey C, Bibeau F, Laune D, Roques S, Gorgou-Bourgadé S, Burlincho S, Boissirere F, et al. Oestrogen receptor negative breast cancer exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Research* 2007; 9: 1-11.

52. García TI, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and its receptors in human benign breast lesions and tumors (in situ and infiltrative). *Cancer Sci* 2006; 97(10): 1044-9.

53. Mattei S, Colombo M, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Meenhard H. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Can* 1994; 56(6): 853-7.

54. Takahiko H, Hiroki M, Shin-ichi H, Hiroshi T, Terufumi S. Transmembrane TNF- $\alpha$  Structure function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010; 10(1093): 1-14.

55. Bermudez C, Parada D. Estudio inmunohistoquímico de la glándula mamaria. *Rev Venez Oncol* 2008; 20(2): 78-90.

56. Varada PR, Poutahidis T, Fox JG, Erdman S. Breast cancers: Should Gastrointestinal bacteria be on our radar screen. *Cancer Res* 2007; 67(3): 847-50.

57. Ferlay J, Shim HR, Bray Forman D, Mathers C, Parkin DM. Informe Globocan2008, Agencia Internacional para la Investigación del cáncer. <http://globocan.iarc.fr/faq.htm>. (Última visita: Septiembre de 2010).

58. Floriano SE, Cárdenas RN, Castro-Marín M. Marcadores moleculares relacionados con cáncer de próstata: Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) y 3-nitrotirosina (3-NT). *Archivos Españoles de Urología* 2000; 62(9): 702-11.

59. Floriano SE, Cárdenas RN, Castro-Marín M. Evaluación de la expresión de la subunidad p22 $phox$  de la NADPH oxidasa (Nox) en

cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. Estudio comparativo. Elsevier Actas Urológicas Españolas 2010; 2: 16-20.

60. Genesser F. Histología 6a. Ed. Vol. 9 Mc Graw-Hill Interamericana; 2005, p. 342-56.

61. López M, Watson H. Alterations in mesenteric lymph node T cell phenotype and cytokine secretion are associated with changes in thymocyte phenotype after LP-BM5 retrovirus infection. Clinical and Developmental Immunology 2005; 12(4): 249-57.

62. Sánchez AG. Neoplasias mamarias y su estudio dentro de la patología ginecológica. Ginecol Obstet Mex 2009; 77(6): 300-7.

63. Benítez J, Osorio A. Genes de susceptibilidad implicados en el cáncer de mama y ovario hereditario. Tesis doctoral. Programa de genética del cáncer humano. Madrid: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas; 2006, p. 359-75.

64. Lewis-Wambi JS, Craig J. Estrogen regulation of apoptosis, how can one hormone stimulate and inhibit. Breast Cancer Research 2009; 11(206): 1-12.

65. Feher J, Lengyel D. The efective and safety of the biological therapy with adalimumab. Evfolyam Orvosi Hetilap 2009; 150(26): 1215-22.

